

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



# **Importância terapêutica das células estaminais do cordão umbilical**

Raquel Sofia Martins Miranda

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2019

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



# **Importância terapêutica das células estaminais do cordão umbilical**

Raquel Sofia Martins Miranda

Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada à  
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

Orientador: Professora Auxiliar, Doutora Isabel Bettencourt Moreira da Silva

2019



## **Resumo**

Desde os anos 80 que o cordão umbilical é reconhecido como uma relevante fonte de células estaminais. O sucesso do primeiro transplante de células estaminais hematopoiéticas, obtidas a partir do cordão umbilical, ocorrido em 1988, motivou a investigação e a argúcia dos mais curiosos nesta área, levando a reconhecer, hoje, o cordão umbilical como uma importante fonte terapêutica de células estaminais para múltiplas situações clínicas.

Apesar da medula óssea ter sido reconhecida, durante mais de uma década, como fonte única de células estaminais, o reconhecimento do cordão umbilical como fonte alternativa, tão ou mais eficaz do que a medula óssea, aliado às múltiplas vantagens inerentes à utilização desta fonte de células, tornaram o cordão umbilical a opção preferencial no isolamento e posterior utilização de células estaminais. Embora as células estaminais do cordão umbilical tenham sido, inicialmente, usadas em doenças hematológicas, o espectro de patologias para as quais fornecem terapia efetiva tem vindo, ao longo dos anos, a ser expandido de forma significativa, contemplando também situações não hematológicas. O cordão umbilical possui diferentes tipos de células estaminais, isoladas não só a partir do sangue, mas também do próprio tecido que o forma, e que partilham entre si a capacidade de autorrenovação, proliferação e diferenciação em várias linhagens celulares. Por esta razão, o campo de aplicações terapêuticas das células estaminais do cordão umbilical estende-se a diversos contextos patológicos, tendo a Medicina Regenerativa assumido uma posição prerrogativa.

A criopreservação de células estaminais, obtidas a partir do cordão umbilical, é uma opção frequentemente adotada, que possibilita contornar a disponibilidade limitada destas células no curto período de tempo, imediatamente, após o parto, e utilizá-las, assim, num futuro próximo ou longínquo, com padrões de qualidade assegurados. Todavia, o uso de células estaminais do cordão umbilical não é isento de questões éticas e jurídicas complexas, bem como de impugnáveis questões que contrabalançam, sempre, os custos e os benefícios desta prática, apoiada pelos mais crentes e desamparada pelos mais céticos.

Face ao exposto anteriormente, a presente revisão bibliográfica aborda questões práticas inerentes à criopreservação de células estaminais derivadas do sangue e tecido do cordão umbilical, desde a sua colheita, processamento e conservação a longo prazo, não descuidando a abordagem dos diferentes tipos de células e de bancos que viabilizam esse processo de criopreservação. O grande potencial de aplicações clínicas atuais e promissoras das células estaminais do cordão umbilical é, ainda, alvo de evidência nesta monografia, dado que a tendência crescente da sua utilização, em todo o mundo, assim o justifica.

**Palavras-chave:** células estaminais, cordão umbilical, criopreservação, bancos de criopreservação, aplicações terapêuticas.

## **Abstract**

The umbilical cord is recognized as a relevant source of stem cells since the 1980's. The success of the first transplantation of hematopoietic stem cells from an umbilical cord in 1988 propelled the investigation in this area, leading to the today's recognition of the umbilical cord as an important therapeutic source of stem cells for several clinical situations.

For more than a decade, bone marrow has been recognized as the only source of stem cells but the recognition of the umbilical cord as an alternative source of stem cells, so or even more effective than bone marrow, with multiple advantages, made it the preferred option. Umbilical cord stem cells were initially used in hematological diseases but the spectrum of pathologies for which they provide effective therapy has been significantly expanded over the years, including for non-hematological conditions. The umbilical cord has different types of stem cells - isolated not only from the blood but also from the tissue itself - which share the capacity for self-renewal, proliferation and differentiation in several cell lines. For this reason, the therapeutic applications of umbilical cord stem cells extend to several pathological contexts, where Regenerative Medicine has a highlighting position.

Cryopreservation of umbilical cord stem cells is a common option, which makes it possible to overcome the limited availability of these cells for a short period of time - immediately after delivery - and to use them in the future, with assured quality standards. However, the use of umbilical cord stem cells also involves complex ethical and legal issues, as well as the questionable issue of the cost/benefit of this practice, that is supported by the believers and abandoned by the skeptical.

The present literature review addresses practical issues related to the cryopreservation of umbilical cord blood and tissue stem cells, their collection, processing and long-term preservation. The different types of cells and banks that make this cryopreservation process viable have also been addressed. The great potential of current and promising clinical applications of umbilical cord stem cells is also an important subject discussed in this monography, considering the increasing trend in using these stem cells throughout the world.

**Key words:** stem cells, umbilical cord, cryopreservation, cryopreservation banks, therapeutic applications.

## Agradecimentos

*“Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo, é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda.”*

**Antoine de Saint-Exupéry, O Príncipezinho**

A jornada foi longa, mas o sonho alcançado! E alcançar o sonho é uma vitória minha, mas também um empreendimento bem-sucedido de todos aqueles que me deram as asas para que eu pudesse voar. E chegando ao cimo da montanha, é linda a vista! É panorâmica, eterna, repleta de cores e rostos; uns simples, outros robustos, mas todos eles com um significado único, uma presença inigualável na minha vida. Por isso, estou certa que chegar ao cimo da montanha é uma vitória minha, mas também um verdadeiro mérito de todos aqueles que deixaram, um dia, a sua marca, seja ela perpétua ou momentânea, neste meu voo. Estou certa que *“aqueles que passam por nós, não vão sós, nunca nos deixam sós; deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”*. De coração cheio, agradeço e sempre agradecerei:

Aos meus pais, pelo suporte que sempre me ofereceram, pela desmedida confiança que desde cedo depositaram em mim. A eles, devo não só o meu percurso académico, mas também o meu percurso de vida!

Ao meu irmão, agradeço a força e a coragem, o incentivo e a confiança que sempre me transmitiu, a paciência e a partilha das vitórias e derrotas. Agradeço o companheirismo de uma vida!

A duas outras pessoas que ocupam um lugar tão especial para mim, o meu padrinho e a minha avó, agradeço o apoio incondicional a todos os níveis, a confiança, o carinho constante e as palavras certas no momento mais preciso.

Aos meus amigos, deixo igualmente um sinal de agradecimento, pelo respeito depositado nesta escolha que foi a minha, pela compreensão nas difíceis épocas de exames e em todos os momentos, onde a coragem fraquejou. E porque houve rostos que passaram, durante este percurso académico, de conhecidos a colegas, de colegas a amigos do peito, há nomes que merecem o destaque pelo brilho que têm. À Dolores, deixo um obrigado por tudo; por ter sido a minha segunda mãe, por ter apaziguado, muitas vezes, os momentos mais complicados, por ter apoiado as minhas vitórias e conquistas, pela amizade eterna e o abraço sempre presente. À Sofia, minha companheira desde o primeiro instante, agradeço os abraços, as conversas partilhadas, a entreaajuda, o grande ser que é. E, finalmente, à minha querida Nídia, agradeço o apoio e a presença sempre constantes em cada momento da minha vida. Obrigada pelas palavras de conforto, pelas gargalhadas, pelo carinho profundo e doce, pela pessoa que levo para a vida.

Não posso, ainda, deixar de agradecer a uma estrelinha especial que olhou sempre por mim, que mesmo longe, estava lá, confiante e orgulhoso, tenho a certeza, do percurso que tracei. Num lugar distante, onde as minhas mãos não tocam as dele e o sorriso dele não vê o meu, cobriu o céu de brilho e sonhos concretizados para que eu fosse feliz. Nunca me retirou

a presença, a ternura do olhar, o conforto do abraço que era o da minha tia, porque sabia que eu precisava do colo dela para suavizar a dor da perda sem retorno que foi a do meu querido tio. Mas, agora, que esta etapa da minha vida chegou ao fim, sei que era justo deixar a tia partir para junto do tio, para o conforto do lugar que ele lhe preparou, como sempre, porque o seu sorriso só estaria completo na presença daquela que foi a sua companheira de vida. E por maior que seja a dor da vossa perda, da certeza do abraço não presente, estou consciente que o céu ganhou dois novos anjinhos, que mesmo sem asas têm o dom de me fazer sorrir. Obrigada! De vocês, tios, guardo a saudade mais bonita, embevecida pelo véu de aprendizagens e ternura que sempre me ofereceram e é, por isso mesmo, que a vocês dedico este trabalho.

E porque ser herói não significa acertar constantemente, mas, sim, ser capaz de reconhecer o erro, de dar um passo atrás para depois dar dois em frente, de cair e erguer-se com a intensa convicção de enfrentar e superar as dificuldades, há ainda uma pessoa a quem tenho, inevitavelmente, de deixar o meu agradecimento. Pela ajuda sempre presente, pelos sábios conselhos cedidos, na procura de mais e melhor, pelo apoio, disponibilidade e amabilidade, desde o primeiro instante, o meu sincero obrigada à Professora Doutora Isabel Bettencourt Moreira da Silva. Deixo, ainda, o meu sinal de agradecimento à Dra. Sílvia Lopes, que, inevitavelmente, contribui para a construção deste trabalho. Não posso deixar de enaltecer a sua simpatia e receptividade no esclarecimento das minhas dúvidas, bem como o contributo prestado na edificação de uma monografia corretamente referenciada.

A todos, o meu enorme obrigado! O título de Farmacêutica pode ser meu, mas este especial canudo também é, de certo, vosso!

*“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante!”*

***Antoine de Saint-Exupéry, O Príncipezinho***

## Lista de siglas e acrónimos

<b>AR</b>	Artrite reumatoide
<b>ASST</b>	Autoridade para os Serviços de Sangue e Transplantação
<b>AVC</b>	Acidente Vascular Cerebral
<b>BPCCU</b>	Banco Público de Células do Cordão Umbilical
<b>CE</b>	Célula estaminal
<b>CECU</b>	Célula estaminal do cordão umbilical
<b>CEEL</b>	Célula estaminal <i>embryonic-like</i>
<b>CEH</b>	Célula estaminal hematopoiética
<b>CEM</b>	Célula estaminal mesenquimal
<b>CEPis</b>	Célula estaminal pluripotente induzida
<b>CESNR</b>	Célula estaminal somática não restrita
<b>CNT</b>	Células nucleadas totais
<b>CPEs</b>	Célula progenitora endotelial
<b>CU</b>	Cordão umbilical
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DC</b>	Doença de Crohn
<b>DECH</b>	Doença do enxerto contra o hospedeiro
<b>DGS</b>	Direção Geral de Saúde
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DP</b>	Doença de Parkinson
<b>EHI</b>	Encefalopatia hipóxica-isquémica
<b>ELA</b>	Esclerose lateral amiotrófica
<b>EAM</b>	Enfarte agudo do miocárdio
<b>FCEV</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>G-CSF</b>	Fator estimulador de colónias de granulócitos
<b>HLA</b>	Antigénio Leucocitário Humano
<b>HLA-DR</b>	Antigénio Leucocitário Humano – Antigénio D relacionado
<b>IPST</b>	Instituto Português do Sangue e da Transplantação
<b>LES</b>	Lúpus eritematoso sistémico
<b>MO</b>	Medula óssea



<b>ONCF</b>	Osteonecrose da cabeça do fêmur
<b>PC</b>	Paralisia cerebral
<b>PLGF</b>	<i>Placental growth factor</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor beta</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>VEGF-A</b>	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>

## Índice geral

1. Introdução .....	13
2. Objetivos .....	15
3. Materiais e Métodos .....	16
4. Células estaminais .....	17
4.1. Caracterização das células estaminais .....	17
4.2. Fontes de células estaminais .....	18
4.3. Classificação das células estaminais .....	18
4.3.1. Quanto à origem .....	18
4.3.2. Quanto ao potencial de diferenciação .....	19
4.3.3. Células estaminais embrionárias vs células estaminais adultas .....	21
4.4. Células estaminais pluripotentes induzidas .....	22
5. Células estaminais do cordão umbilical .....	23
5.1. Células estaminais hematopoiéticas .....	23
5.2. Células estaminais mesenquimais .....	24
5.3. Células progenitoras endoteliais .....	25
5.4. Células estaminais somáticas não restritas .....	26
5.5. Células estaminais <i>embryonic-like</i> .....	27
6. Transplante de células estaminais .....	28
6.1. Transplante de células estaminais da medula óssea .....	30
6.2. Transplante de células estaminais do cordão umbilical .....	30
7. Criopreservação de células estaminais do cordão umbilical .....	33
7.1. Metodologia intrínseca .....	34
7.1.1. Decisão de doação .....	34
7.1.2. Colheita e transporte do local de recolha para o Banco de Criopreservação .....	35
7.1.3. Processamento .....	37
7.1.4. Criopreservação .....	38
7.1.4.1. Método de congelamento por adição de crioprotetor DMSO, após redução de glóbulos vermelhos .....	41
7.1.4.2. Método de congelamento por adição de crioprotetor DMSO, após redução plasmática .....	41
7.1.4.3. Método de congelamento lento .....	41
7.1.4.4. Método de vitrificação .....	41
7.1.5. Descongelamento e lavagem .....	43
7.1.6. Transporte desde o Banco de Criopreservação até ao local de utilização .....	44

8.	Bancos de criopreservação .....	45
8.1.	Bancos públicos .....	45
8.2.	Bancos privados .....	46
8.3.	Bancos públicos vs bancos privados .....	47
8.4.	Contexto em Portugal .....	48
8.5.	Contexto na Europa e no Mundo .....	50
9.	Questões éticas .....	51
10.	Importância terapêutica das células estaminais do cordão umbilical .....	53
10.1.	Aplicabilidade terapêutica atual das células estaminais do cordão umbilical .....	53
10.2.	Aplicabilidade terapêutica potencial das células estaminais do cordão umbilical .....	56
10.2.1.	Doenças neurológicas.....	57
10.2.2.	Doenças cardiovasculares .....	60
10.2.3.	Doenças autoimunes.....	62
10.2.4.	Doenças ortopédicas e cartilagíneas.....	64
10.2.5.	Regeneração de feridas .....	64
10.2.6.	Produção de componentes sanguíneos .....	65
11.	Conclusões e perspectivas futuras.....	66
12.	Referências bibliográficas .....	69

## **Índice de figuras**

Figura 1 – Características das células estaminais .....	18
Figura 2 – Potencial de diferenciação das células estaminais .....	20
Figura 3 – Formação e aplicações de células estaminais pluripotentes induzidas.....	22
Figura 4 - Diferenciação de células estaminais hematopoiéticas.....	24
Figura 5 - Diferenciação de células estaminais mesenquimais.....	25
Figura 6 – Etapas do processo de criopreservação de células estaminais do cordão umbilical .....	44
Figura 7 – Principais aplicações terapêuticas potenciais das células estaminais do cordão umbilical .....	57

## **Índice de tabelas**

Tabela 1 – Classificação das células estaminais quanto à sua origem e potencial de diferenciação.....	21
Tabela 2 – Comparação das vantagens e desvantagens inerentes ao transplante de células estaminais do cordão umbilical e da medula óssea.....	32
Tabela 3 – Comparação dos métodos de congelamento lento e vitrificação.....	42
Tabela 4 – Bancos públicos vs bancos privados .....	47
Tabela 5 – Aplicabilidade terapêutica atual das células estaminais do cordão umbilical.....	54

## 1. Introdução

A capacidade de autorrenovação aliada à elevada taxa de proliferação e potencial de diferenciação em células especializadas são características únicas, que tornam as células estaminais (CE) uma fonte promissora de alternativas terapêuticas. (1,2) Ainda que estas células possam ser encontradas, praticamente, em todos os órgãos e tecidos do organismo adulto, bem como fluidos corporais, é ao nível da medula óssea (MO), sangue periférico e cordão umbilical (CU) que estas células estão presentes em elevado número. (1–4)

Nos últimos anos, o CU tem sido alvo de inúmeros estudos que têm reforçado o seu potencial terapêutico em diversos contextos patológicos, deixando este, por isso, de ser visto somente como um excedente do parto. (5) O sangue do CU constitui um ponto de acesso fulcral a diferentes tipos de CE, das quais se destacam as células estaminais hematopoiéticas (CEH) capazes de se diferenciarem em todos os elementos da linhagem sanguínea, (1,6) bem como as células progenitoras endoteliais (CPEs) comprometidas com a diferenciação em células endoteliais que sustentam o processo de angiogénese, (7–9) e ainda as células estaminais somáticas não restritas (CESNR) e as células estaminais *embryonic-like* (CEEL) que constituem subpopulações celulares com uma ampla capacidade de diferenciação em vários tipos de células das três camadas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme. (10–13) O sangue do CU constitui, assim, o principal elemento para recolha de CE, mas não o único, já que, paralelamente a este, o próprio tecido do CU permite isolar células estaminais mesenquimais (CEM) capazes de originar células de diferentes tecidos. (3,6,12) Pelo valor acrescido do CU, como fonte de diversos tipos de CE, o interesse nesta fonte tem vindo a crescer nos últimos anos, conquistando um lugar privilegiado e uma escolha preferencial quando falamos no transplante hematopoiético, (12) onde, durante mais de uma década, a MO foi fonte única de CE. (14) No entanto, hoje, o cenário inverteu-se e a eficácia do CU no transplante hematopoiético é comprovada por diversos estudos, como semelhante ou até mesmo superior à da MO. (12) Embora a quantidade de CE isoladas do CU seja uma limitação, a maior facilidade de obtenção, a colheita indolor e não invasiva, a maior tolerância a incompatibilidades de antigénio leucocitário humano (HLA) e a ausência de risco cirúrgico são vantagens que concorrem para o uso desta fonte de CE e que têm contribuído, fortemente, para os esforços desenvolvidos na procura de estratégias capazes de colmatar esta limitação. (12,15)

O uso de células estaminais do cordão umbilical (CECU) é uma prática que compromete requisitos de qualidade técnico-científica, aliados a requisitos éticos, já que o respeito pela dignidade individual e a justiça da sociedade envolvida nunca devem estar em causa. (16) Pela complexidade do processo, são diversas as questões que se prendem com a utilização de CECU, quer relacionadas com a sua colheita, como também com a sua conservação e com os tipos de bancos que a viabilizam. Igualmente, questões éticas suscitam controvérsia nesta área, uma vez que a ausência de unanimidade de opiniões é sustentada por diferentes posições éticas ajustadas à realidade, aos ideais e aos padrões de cada país. (17) É, por isso, fundamental que cada país acompanhe a evolução dos progressos científicos nesta área, analisando-os critica e meticulosamente, sob a voz de uma comissão de ética que zele por um modelo igualitário de justiça social e individual. (18,19)

Conhecer todos os requisitos técnicos, científicos e éticos inerentes à utilização de CECU constitui, então, o foco desta monografia, não descuidando o conhecimento da aplicabilidade terapêutica destas células a diferentes contextos patológicos, quer atuais, quer futuros. A utilização reconhecida e consolidada de CECU, em patologias da área oncológica, hematológica, metabólica, imunitária e medular, tem sido acompanhada por um intenso trabalho de pesquisa e experiência terapêutica, que sustenta o promissor papel destas células na medicina do futuro – a Medicina Regenerativa. (12,20,21) Reconstruir tecidos lesados, substituir células e originar novas que o organismo humano deixa de ser capaz de produzir constituem as potenciais aplicações terapêuticas das CECU, sob as quais os estudos atuais se têm debruçado e onde, essencialmente, o tecido do CU tem assumido um lugar de destaque. (22) Neste sentido, os estudos mais atuais desenvolvidos na área, e publicados em distintas revistas e compêndios científicos, constituíram a base para a recolha da informação abordada nesta monografia. Todavia, a realização de estudos de aplicação terapêutica de CECU, em modelo animal, e a posterior dificuldade de transposição dos resultados para a espécie humana constituem uma das limitações observadas na análise da informação recolhida. Também o uso de amostras relativamente pequenas, com padrões e características de saúde próprias, sob tratamentos específicos, representa outra das limitações a apontar nos resultados dos estudos usados, impossibilitando, assim, a extrapolação de tais resultados à população em geral.

Ainda que, nos últimos anos, o progresso científico tenha vindo a contribuir, fortemente, para o que hoje se conhece sobre o potencial terapêutico das CECU, o conhecimento íntegro desta área está, ainda, longe de ser alcançado. A necessidade de desenvolver mais estudos, a fim de colmatar os obstáculos do presente e fomentar novas oportunidades futuras, é um facto, desde já presente, na realização desta revisão bibliográfica.

## **2. Objetivos**

Embora a investigação e a utilização de CECU tenham já alguns anos, assiste-se ao anúncio, quase diário, de pequenos avanços que perspetivam a sua utilização num âmbito mais alargado. A verdade é que as CECU continuam a ser objeto de grande interesse científico, sendo, por isso, tema de constante debate e controvérsia, quer entre os mais leigos, quer na própria comunidade científica, o que justifica a atualidade da presente monografia. Assim sendo, o objetivo *major* desta monografia consiste na pesquisa e seleção da informação de maior relevância que tem surgido, nos últimos anos, em torno do potencial terapêutico das CECU.

Uma vez que se trata de uma área em constante expansão, esta monografia procura não só expor, mas também analisar, criticamente, o que de mais recente e inovador tem surgido nesta área, quer em termos de aplicações terapêuticas, métodos de manipulação celular, técnicas de criopreservação e tipos de CE. E porque o progresso tece-se de futuro e não, somente, de presente, este trabalho monográfico procura, ainda, perspetivar o futuro de um campo da medicina, onde a velocidade atual da investigação das CECU parece abrir as portas à esperança de uma maior e melhor qualidade de vida e de uma maior longevidade humana.



### 3. Materiais e Métodos

A presente monografia, intitulada “*Potencial terapêutico das CECU*”, foi elaborada entre março e setembro de 2019, a partir de uma revisão e seleção da informação mais atual e pertinente disponível na área.

A recolha da informação, para posterior análise e tratamento, foi realizada a partir de uma pesquisa específica e direcionada, nas bases de dados científicas eletrónicas *Pubmed/Medline*, *SciELO*, *Sciencedirect* e *Google Scholar*, com recurso a palavras chave gerais, mas, também, específicas do tema de cada capítulo e/ou subcapítulo. Neste sentido, foram usadas diversas palavras chave quer isoladamente, quer em combinação, de entre as quais se destacam: *stem cells; embryonic stem cells; fetal stem cells; neonatal stem cells; adult stem cells; induced pluripotent stem cells; umbilical cord; umbilical cord stem cells; hematopoietic stem cells; mesenchymal stem cells; endothelial progenitor stem cells; unrestricted somatic stem cells; embryonic-like stem cells; transplantation of bone marrow stem cell; transplantation of umbilical cord stem cells; cryopreservation of umbilical cord stem cells; cryopreservation banks; cryopreservation banks in Portugal; cryopreservation banks in Europe and worldwide; ethical issues; therapeutic application of umbilical cord stem cells; regenerative medicine; neurological diseases; cardiovascular diseases; autoimmune diseases; orthopedic and rheumatic diseases; wound healing e production of blood components*. As palavras chave utilizadas, maioritariamente em língua inglesa, e em situações pontuais em língua portuguesa, possibilitaram o acesso a artigos científicos e a documentos, nacionais e internacionais, publicados nas mais conceituadas e prestigiadas revistas, no âmbito das áreas da Biologia, Bioquímica, Hematologia, Imunologia e Medicina. A informação publicada, por entidades certificadas, credenciadas e de notável prestígio na área das CECU foi igualmente utilizada, tendo o seu acesso sido alcançado através das palavras chave citadas anteriormente.

Com o intuito de recolher informação adequada ao atual estado da arte da temática em estudo foram impostos limites temporais à pesquisa, tendo sido excluída toda a informação respeitante a anos anteriores a 2005, bem como dada especial ênfase à informação respeitante aos últimos 3 anos, isto é, publicada entre 2016 e 2019. Foram selecionados artigos científicos experimentais, usando modelos animais e humanos, assim como artigos científicos de revisão, por vezes citados noutras publicações e/ou publicados por empresas, entidades ou organismos especializados na área e que, por isso, lhe acrescentam valor científico e credível.

## **4. Células estaminais**

As CE, também conhecidas como células-mãe, podem definir-se como células primordiais indiferenciadas, o que significa que não apresentam qualquer especialização funcional. (1,3) Estas células possuem a capacidade de se dividirem e autorrenovarem indefinidamente, produzindo novas CE com as mesmas propriedades, isto é, cópias de si mesmas. (3,23,24)

Por outro lado, as CE possuem também a capacidade de se diferenciarem, podendo originar os diversos tipos de células altamente especializadas e maduras, que constituem os tecidos e órgãos do corpo humano. (23,24) Tal especialização ocorre ao longo de toda a vida, pelo que as CE podem ser encontradas desde o embrião até à idade adulta. (2,3)

A partir das CE somáticas formam-se células morfológicas e funcionalmente especializadas ou adultas, por meio de uma divisão assimétrica que origina dois tipos de células com destinos distintos: uma diferencia-se numa célula adulta do tecido do qual provém, e a outra mantém as características de CE. Durante esta evolução biológica, as CE somáticas alcançam um estágio intermédio de diferenciação, no qual passam a ser designadas de células progenitoras. Neste estágio intermédio de diferenciação, as células progenitoras já apresentam, irreversivelmente, um compromisso com a via de diferenciação a seguir, embora esta esteja sempre dependente do tecido onde se encontram. (2)

O processo de diferenciação celular e o destino das CE é influenciado por uma combinação de sinais extrínsecos (como moléculas de sinalização intercelulares, interações entre células estaminais e células vizinhas ou até interações com a matriz extracelular) e sinais intrínsecos (como genes que codificam funções e estruturas celulares). O destino das células estaminais pode ainda ser influenciado por condições externas, como é o caso da temperatura, pH, componentes do soro, fatores de crescimento, hormonas, glucose e oxigénio. (25,26)

As CE funcionam como um sistema de autorrenovação contínua do organismo, já que permitem reparar órgãos e tecidos danificados, bem como substituir células que diariamente vão envelhecendo e morrendo, como é o caso das células da pele, cabelo, sangue e revestimento intestinal. (2,3,23,24)

### **4.1. Caracterização das células estaminais**

As características únicas das CE, evidenciadas na Figura 1, permitem a sua distinção face a todas as outras células do organismo. (1) De entre essas características podem destacar-se:

- Autorrenovação: capacidade de criar novas CE, já que estas se reproduzem por um processo de divisão contínua, durante períodos de tempo indefinidos; (1,2,23,27)
- Diferenciação: capacidade de gerar diferentes tipos de células especializadas que constituem o organismo (ex.: células sanguíneas, musculares, nervosas). (2,3,23,27) Face às alterações biológicas que acompanham a evolução do embrião até ao

indivíduo adulto, as CE perdem progressivamente a sua potencialidade, ou seja, a capacidade de diferenciação celular. Assim, pode inferir-se que esta competência é superior nas CE obtidas nos estádios iniciais do desenvolvimento embrionário face às CE adultas. (2)

- Plasticidade: característica que possibilita a manipulação, em laboratório, das CE, sem que estas percam as suas capacidades funcionais. (2,27)

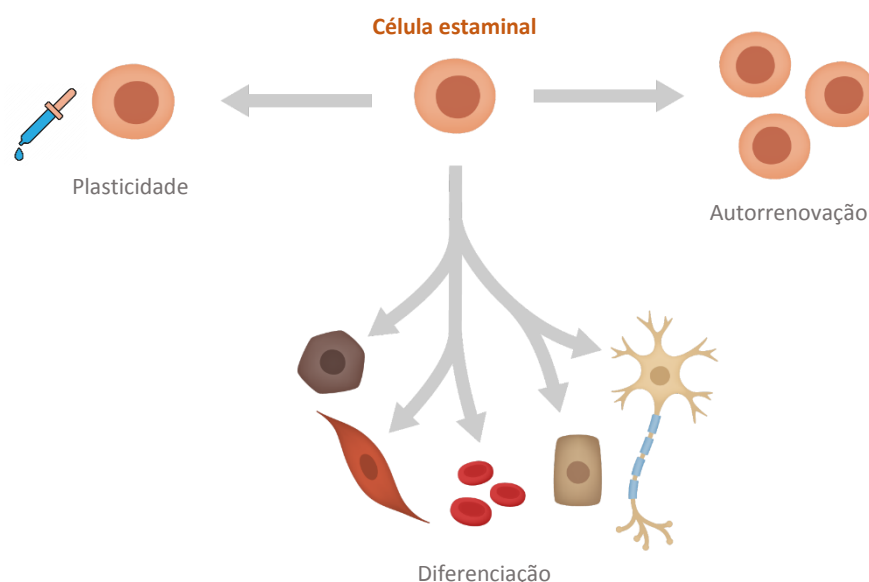


Figura 1 – Características das células estaminais. (Adaptada de 28)

## 4.2. Fontes de células estaminais

As CE podem ser obtidas a partir de diferentes fontes do organismo humano, sendo as principais o CU - sangue e tecido, a MO e o sangue periférico. (1–3) No entanto, para além das fontes referidas anteriormente, as CE adultas podem ser encontradas em praticamente todos os órgãos e tecidos do organismo adulto (pele, cérebro, coração, vasos sanguíneos, músculo esquelético, intestino, fígado, rins, mucosa nasal, polpa dentária, tecido adiposo e órgãos reprodutivos), assim como em fluidos corporais, de que são exemplo o sangue (incluindo o sangue menstrual) e a urina. (3,4)

## 4.3. Classificação das células estaminais

### 4.3.1. Quanto à origem

As CE podem classificar-se, em função da sua origem, em embrionárias e não embrionárias, podendo estas últimas subdividir-se em CE fetais, CE neonatais e CE adultas. (2–4)

As CE embrionárias são obtidas a partir do embrião numa fase inicial do seu desenvolvimento (2), podendo originar qualquer tipo de célula do organismo humano. São, assim, um tipo de células totalmente indiferenciadas e que detêm o potencial máximo de diferenciação celular. (3,23,24) O ovo fertilizado ou zigoto é a CE mais indiferenciada, a partir da qual se formam os tecidos que constituem o próprio embrião, assim como tecidos essenciais ao desenvolvimento embrionário, tais como a placenta e o CU. (3) A utilização de CE embrionárias está associada a relevantes questões éticas, não sendo, por isso, consideradas as células preferenciais para o processo de criopreservação. (2)

As CE não embrionárias, em particular as adultas, também chamadas de somáticas, podem encontrar-se em tecidos especializados do organismo adulto, nomeadamente, MO, músculo esquelético, fígado, sangue ou tecido adiposo. (3,4,23) Têm uma capacidade de diferenciação celular limitada, uma vez que, contrariamente às CE embrionárias, apenas conseguem originar células da sua linhagem embrionária, isto é, células do tecido onde se encontram. (3,23,24) No entanto, continuam a apresentar potencial de autorrenovação durante toda a vida do organismo humano (2), pelo que possuem uma importante função na reparação de lesões do tecido do qual fazem parte. (3)

As CE dos tecidos fetais podem ser obtidas durante o período de gestação, a partir do tecido fetal (4), enquanto as CE neonatais são obtidas após o nascimento do neonato, a partir de tecidos neonatais, como a placenta, o líquido amniótico, a Geleia de Wharton do CU e o sangue do CU. (29–31) O potencial de diferenciação deste tipo de células é superior ao das CE dos tecidos adultos. (2,3) Por esta razão, as células do sangue e tecido do CU correspondem às células atualmente recolhidas no momento do parto e posteriormente criopreservadas. (2)

#### **4.3.2. Quanto ao potencial de diferenciação**

A classificação das CE, quanto à sua capacidade de produzir novas linhagens celulares, e tal como é evidenciado na Figura 2, pode ser feita por ordem decrescente de potencialidade em: células totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes. (2,23)

As CE totipotentes são células completamente indiferenciadas, detentoras da capacidade máxima de diferenciação celular. (2) Sabe-se que, ao longo da embriogénese, se observa uma limitação gradual do potencial de diferenciação das células que constituem o embrião. Por isso, apenas o zigoto ou oócito fecundado e os blastómeros (células que constituem a mórula no estado de 2 a 8 células) são considerados células totipotentes, já que a partir delas se podem formar todas as células diferenciadas que constituem o embrião, bem como os tecidos essenciais ao seu desenvolvimento (parte fetal da placenta, CU e membranas extraembrionárias). (2,4,23,25) Estas células totipotentes têm a capacidade de, após alguns ciclos de divisão celular, formar uma estrutura embrionária, na qual as células perdem potencial de diferenciação e iniciam a sua especialização. Esta estrutura é designada blastocisto e corresponde a uma esfera oca formada por uma parede de células externas (trofoblasto), que delimitam uma cavidade (blastocélio) e que reúnem num dos polos um agregado celular (botão embrionário). (23–25) Enquanto a capacidade de originar tecidos extraembrionários está restrita às células do trofoblasto, somente às células do botão embrionário é concedida a capacidade de formar uma estrutura precursora do embrião propriamente dito, o epiblasto. É a partir do epiblasto que se formam, posteriormente, três

camadas germinativas embrionárias (mesoderme, endoderme e ectoderme). Assim, o botão embrionário é formado por CE pluripotentes, já que estas possuem capacidade de originar, a partir das três camadas embrionárias, diferentes tipos de tecidos especializados, com exceção dos anexos embrionários. (2,25,32) Por esta razão, as células pluripotentes do botão embrionário não têm, por si só, capacidade de originar um indivíduo. (25) Este tipo de células está presente no embrião até ao 14º dia do desenvolvimento embrionário (fase de gastrulação) e corresponde às CE embrionárias. (2,25)

Já no indivíduo adulto existem CE consideradas multipotentes, pois embora capazes de se autorrenovar, a sua capacidade de diferenciação está restrita a linhagens de células específicas dos tecidos ou órgãos dos quais fazem parte. (2,25) As CE multipotentes podem, assim, ser encontradas em tecidos adultos, de que são exemplo a MO ou o sangue periférico, e derivam de uma das três camadas embrionárias referidas anteriormente. (2,33) Embora as CE multipotentes tenham uma especialização limitada a uma ou mais linhagens celulares, as CE unipotentes veem a sua capacidade de diferenciação restrita somente a uma única célula ou tecido. (33,34) São por isso as CE dos tecidos adultos mais especializadas, continuando, contudo, a beneficiar da marcante capacidade de autorrenovação. (34)

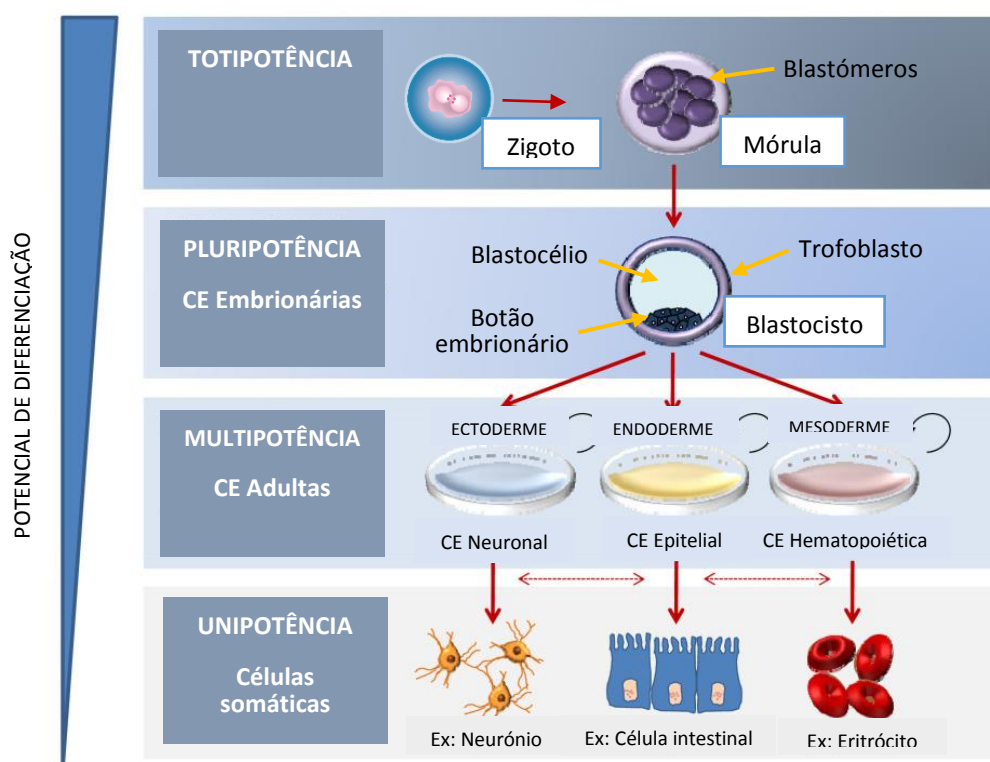


Figura 2 – Potencial de diferenciação das células estaminais. (Adaptada de 35)

A classificação das CE, quer em função da sua origem, quer do potencial de diferenciação, pode encontrar-se resumida na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação das células estaminais quanto à sua origem e potencial de diferenciação. (Adaptada de 4)

Células estaminais	Origem	Potencial de diferenciação
Embrionárias	Mórula	Totipotência
	Blastocisto	Pluripotência
Fetais e Neonatais	Tecido Fetal	Pluripotência e Multipotência
	Tecidos Neonatais	Pluripotência e Multipotência
	Placenta (âmnio e córion)	Pluripotência e Multipotência
	Fluido amniótico	Pluripotência e Multipotência
	Geleia de Wharton do CU	Pluripotência e Multipotência
Adultas	Sangue do CU	Multipotência
	Medula óssea	Pluripotência, Multipotência e Unipotência
	Outros tecidos e órgãos (ex: tecido adiposo, pele, músculo esquelético, fígado, sangue)	Pluripotência, Multipotência e Unipotência

#### 4.3.3. Células estaminais embrionárias vs células estaminais adultas

A utilização de CE em terapias regenerativas deve sempre considerar as significativas diferenças entre CE embrionárias e CE adultas. Uma dessas grandes diferenças prende-se com o número e o tipo de células diferenciadas que podem originar. (24)

As CE embrionárias, graças à sua pluripotência natural e capacidade proliferativa, podem originar qualquer tipo de célula do organismo humano, possuindo uma gama de aplicações mais extensa do que as CE adultas. (24,36) Embora tais características possam contribuir para que, aparentemente, as CE embrionárias sejam mais vantajosas do que as CE adultas, a sua enorme plasticidade e capacidade proliferativa contribuem fortemente para a formação de tumores, no local alvo ou perifericamente sob a forma de metástases, quando usadas em transplantes. Outra limitação das CE embrionárias reflete-se na dificuldade técnica de conduzir a sua diferenciação para o tipo celular pretendido. (36)

Já as CE adultas, enquanto células multipotentes, possuem uma capacidade de diferenciação limitada, originando células-filhas do mesmo tipo de células do tecido de origem. Tal facto, contribui para que este tipo de CE apresente uma maior eficácia em processos regenerativos, minimizando a possibilidade de rejeição pelo sistema imunitário, após o transplante. Para além da vantajosa utilização em regenerações, as CE adultas, face às embrionárias, são ainda menos propensas à formação de tumores, pela menor capacidade proliferativa que apresentam. No entanto, a cultura e o isolamento das CE adultas constituem um obstáculo à sua utilização, uma vez que estas estão presentes em pequenas populações celulares dos tecidos e órgãos de interesse e os métodos de expansão celular *in vitro* são limitados. (24,36)

#### 4.4. Células estaminais pluripotentes induzidas

As células estaminais pluripotentes induzidas (CEPis) surgiram pela primeira vez em 2006, na sequência de trabalhos desenvolvidos pelos investigadores japoneses Takahashi e Yamanaka. Os investigadores introduziram uma combinação de quatro fatores de transcrição (Oct4, Sox2, Klf4 e cMyc) em fibroblastos de murganhos adultos, por meio de retrovírus, observando uma reprogramação das células somáticas para um estado de pluripotência, idêntico ao das CE embrionárias. Um ano mais tarde, em 2007, o mesmo grupo de investigadores gerou as primeiras CEPis humanas a partir de fibroblastos, voltando a demonstrar o comportamento destas células como CE embrionárias. (24,36,37)

Pode, então, afirmar-se que as CEPis são células adultas, geneticamente reprogramadas, de modo a originar células pluripotentes e, portanto, com características idênticas às CE embrionárias. (24) Têm capacidade de autorrenovação e são capazes de se diferenciar em qualquer tipo de célula das três camadas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme (24,36,38), em resposta à modulação de fatores de crescimento e/ou vias de sinalização específicas. (38) Embora as CEPis tenham inicialmente sido obtidas a partir de fibroblastos, a sua obtenção pode ser feita a partir de outras células somáticas, originárias das três camadas germinativas (36,37), como ilustrado na Figura 3. Assim, as CEPis podem ser obtidas a partir de células presentes no CU, em particular, das CE hematopoiéticas presentes no sangue ou das CE mesenquimais da Geleia de Wharton. (6,24,26)

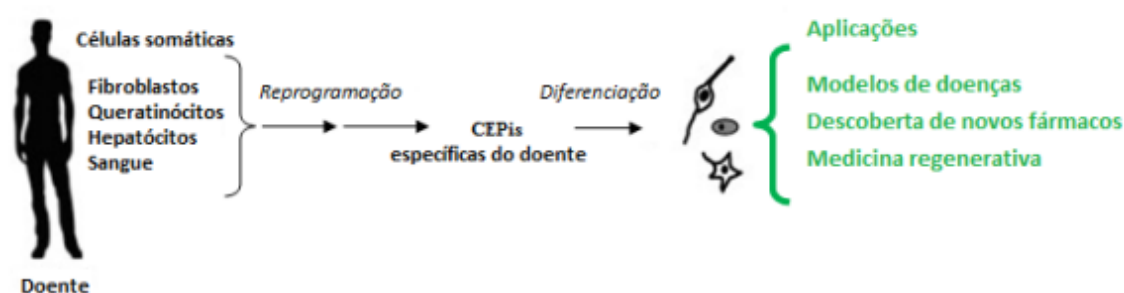


Figura 3 – Formação e aplicações de células estaminais pluripotentes induzidas. (Retirada de 36)

As CEPis são promissoras em futuras terapias celulares, visto constituírem uma fonte ilimitada de células autólogas indiferenciadas, pelo que o seu uso não alia considerações éticas. No entanto, o risco de formação de teratomas e de outros cancros, devido ao processo de reprogramação destas células, é ainda uma barreira a ultrapassar na utilização das CEPis. (25,37) Assim, uma vasta investigação tem sido desenvolvida nesta área, com o intuito de melhorar processos de reprogramação e diferenciação celular, que viabilizem posteriormente a utilização clínica das CEPis na transplantação e regeneração de tecidos danificados. (24,25,37)

## **5. Células estaminais do cordão umbilical**

O CU é uma estrutura física formada a partir dos anexos embrionários saco vitelino e alantoide, (15) que permite a comunicação entre o feto e a placenta, possibilitando, deste modo, o fluxo sanguíneo entre a circulação fetal e materna. (3,15) Esta estrutura é constituída por vasos sanguíneos (duas artérias e uma veia), envolvidos por uma substância gelatinosa (Geleia de Wharton) que, pelas fibras de colagénio que possui, não só protege os vasos umbilicais, como os impede de colapsarem, e proporciona ainda flexibilidade ao CU. (3,15)

Embora, durante muitos anos, o CU tenha sido visto somente como um excedente do parto, hoje é considerado uma relevante fonte de CE, com acrescido potencial terapêutico. Não só o sangue presente no interior do CU constitui uma fonte de CE, que permitem originar todos os elementos do sistema sanguíneo e imunitário - CEH, como também o tecido do próprio CU apresenta CE capazes de originar células de diferentes tecidos, como as CEM. (5)

A obtenção das CECU é não invasiva, indolor e não evoca questões éticas, como aquelas que se verificam aquando da utilização das CE embrionárias. (39) Assim, as CECU não só são mais facilmente isoladas, como também apresentam uma menor imunogenicidade, comparativamente às CE provenientes de outras fontes, de que é exemplo a MO. Tal facto revela-se vantajoso, na medida em que permite um maior sucesso terapêutico, quer no transplante alogénico, quer no transplante autólogo. (10,39) Tanto no sangue, como no tecido do CU, podem ser encontrados diferentes tipos de CE, cada um deles com características particulares.

### **5.1. Células estaminais hematopoiéticas**

As CEH correspondem a uma população de células presentes no sangue do CU, que apresentam a capacidade de se diferenciarem em todas as células da linhagem sanguínea. (1,6) Tal como evidenciado na Figura 4, a CEH, como célula pluripotente, possui capacidade de se diferenciar em células multipotentes das séries mieloide e linfoide, que posteriormente se especializam nas diferentes células do sistema sanguíneo e imunitário. (6)

As CEH são as que se encontram em maior quantidade no sangue do CU e caracterizam-se pela expressão dos marcadores CD34+ e CD133+, constituindo este último um marcador mais primitivo. (12,40) O sangue do CU é uma fonte de CE que se aproxima mais das CE embrionárias, do que a maioria das CE adultas, o que lhe confere um maior potencial de diferenciação e proliferação, face às CE adultas. (12)

Este tipo de células apresenta semelhanças com as CE da MO (1), razão pela qual constituem, atualmente, uma importante alternativa à MO nos transplantes hematopoiéticos. (6) A sua utilização é ainda motivada por múltiplas vantagens, face às células hematopoiéticas da MO, nomeadamente, maior imaturidade, o que lhes confere maior capacidade proliferativa, maior aceitabilidade no grau de compatibilidade de HLA entre o dador e o recetor, maior acessibilidade e maior plasticidade, o que lhes permite preservar a sua capacidade funcional, após manipulação em laboratório. (41–43) Contudo, a baixa quantidade de CEH que é possível isolar, a partir do CU, constitui a grande limitação à sua utilização, já que não



consegue suprir as necessidades dos doentes a transplantar, dificultando o sucesso terapêutico. (40,43) Neste sentido, tem-se assistido a um desenvolvimento de métodos de expansão celular, *ex vivo*, a fim de alcançar um número de CEH compatíveis com as necessidades do transplante. (40,43,44)

Como fonte promissora de CE na área da Medicina Regenerativa, as CEH do CU possuem uma importância clínica reconhecida nos transplantes hematopoiéticos, a fim de dar resposta a patologias do foro hemato-oncológico, em que é necessário regenerar o sistema hematológico e imunitário. (6,12)

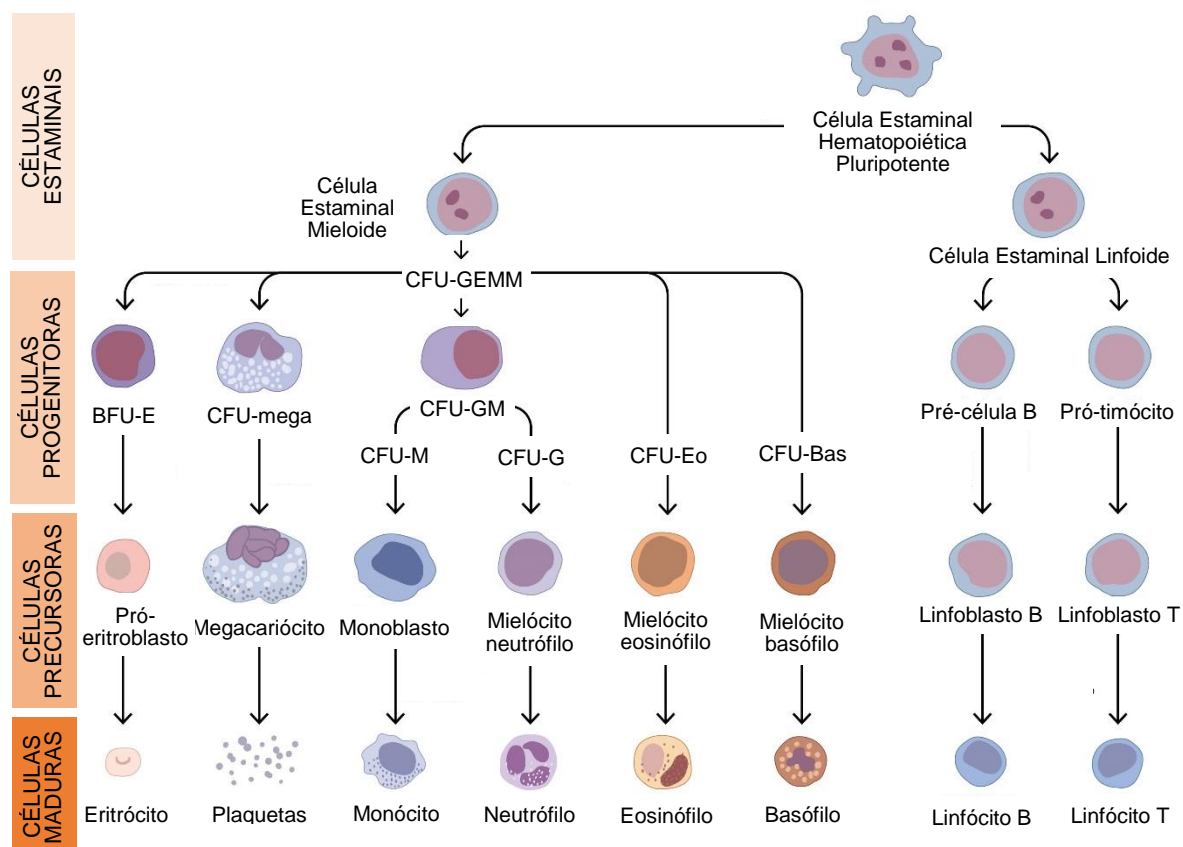


Figura 4 - Diferenciação de células estaminais hematopoiéticas. (Adaptada de 45-47)

Legenda: CFU-GEMM: unidades formadoras de colônias de granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos; BFU-E: unidades formadoras de grupos de células eritroides; CFU-mega: unidades formadoras de colônias de megacariócitos; CFU-GM: unidades formadoras de colônias de granulócitos e monócitos/macrófagos; CFU-G: unidades formadoras de colônias de granulócitos; CFU-M: unidades formadoras de colônias de monócitos; CFU-Eo: unidades formadoras de colônias de eosinófilos; CFU-Bas: unidades formadoras de colônias de basófilos.

## 5.2. Células estaminais mesenquimais

As CEM correspondem a uma população de células progenitoras multipotentes, com valor terapêutico acrescido, capazes de suportar a hematopoiese e a diferenciação em várias linhagens celulares. (6) O tecido do CU constitui a principal fonte de CEM, detentoras de propriedades distintas das células do sangue do CU, que, tal como é evidenciado na Figura

5, possuem capacidade de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, entre outras linhagens celulares, capazes, por sua vez, de originar diferentes órgãos e tecidos. (3,12)

Ainda que as CEM possam ser isoladas a partir de vários tecidos, nomeadamente, MO, tecido adiposo e sangue do CU, o tecido do CU apresenta-se como a fonte mais vantajosa, uma vez que viabiliza uma colheita fácil e isenta de riscos, com uma menor probabilidade de infeção por agentes virais e bactérias. Para além disso, o tecido do CU permite o isolamento de um elevado número de células, com potencial de diferenciação e proliferação superior ao das outras fontes de CEM. (5) Paralelamente a todas estas vantagens, o valor das CEM centra-se ainda na sua capacidade imunomoduladora, permitindo, assim, atenuar a resposta do sistema imunitário, quando usadas, por exemplo, como coadjuvante no transplante hematopoiético. (1,5,6) Deste modo, a utilização de CEM melhora substancialmente o sucesso do transplante alogénico, em que o dador e o recetor são indivíduos diferentes, (1,5,6) bem como de outras patologias com envolvimento do sistema imunitário. (48,49) O potencial terapêutico das CEM do tecido do CU está ainda em expansão. (1) No entanto, estudos experimentais, ensaios pré-clínicos e clínicos têm vindo a revelar o grande potencial de utilização destas células multipotentes, em áreas como a Medicina Regenerativa de tecidos e órgãos. (1,5) O seu potencial terapêutico pode associar-se à capacidade de produção de fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, promovendo e melhorando o processo regenerativo dos tecidos e órgãos. (6,49)

Uma vez que não existe um marcador único na identificação das CEM humanas, definiu-se que estas são identificadas como tal, sempre que se expressam positivas para os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, e negativas para os marcadores CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$ , CD19 e HLA-DR. (48,50)

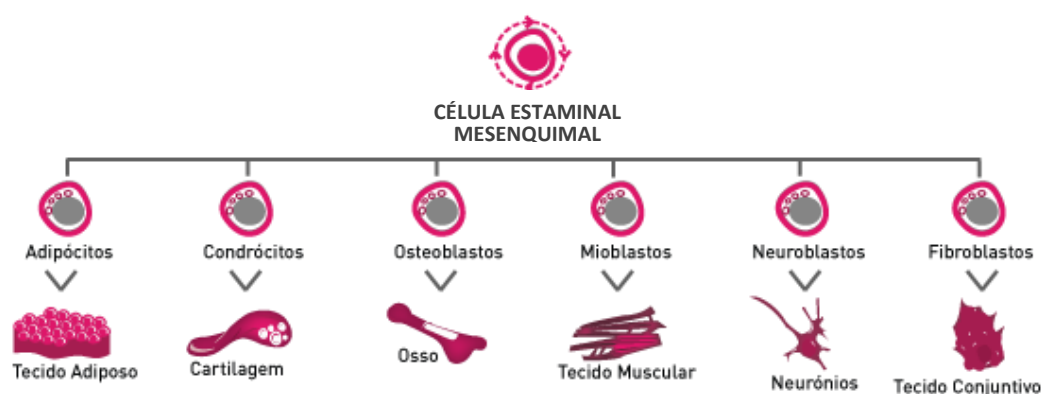


Figura 5 - Diferenciação de células estaminais mesenquimais. (Adaptada de 6)

### **5.3. Células progenitoras endoteliais**

As células progenitoras são das primeiras descendentes das CE e, tal como estas, possuem capacidade de diferenciação, mas não de autorrenovação. Correspondem a um tipo de células parcialmente diferenciadas, estando, por isso, já comprometidas com uma determinada linhagem celular. (7)

As células progenitoras capazes de se diferenciar em células endoteliais funcionais e sustentar a angiogénese ou neovascularização são designadas CPEs. (8) Estas células podem ser encontradas no sangue do CU, sangue periférico, MO e revestimento das paredes dos vasos sanguíneos, (9,51) podendo classificar-se em precoces ou tardias, em função do momento em que surgem na circulação e do local da lesão. (51) Desde os primeiros estudos realizados com CPEs que se conhece o seu papel acrescido na restauração da integridade do endotélio após uma lesão. (51) Estas células são capazes de incorporar o endotélio lesado, com consequente formação de um vaso sanguíneo funcional, bem como secretar localmente fatores pró-angiogénicos (citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas) com um efeito parácrino sobre as células que realmente formam o vaso sanguíneo. (8,51,52) Assim, enquanto as CPEs de crescimento precoce promovem a angiogénese de forma parácrina, as CPEs tardias participam diretamente na neovascularização endotelial. (52) Estudos recentes têm demonstrado que as CPEs apresentam ainda capacidade de produção de agentes vasodilatadores, como o óxido nítrico. (51)

As CPEs possuem, deste modo, um elevado potencial terapêutico na área da Medicina Regenerativa, pela sua capacidade de estimular a reparação vascular em condições fisiológicas e patológicas, e no tratamento de doenças vasculares, onde têm sido estudadas como biomarcadores. (8,9,53) Ainda que, nos últimos anos, a investigação científica nesta área tenha crescido, a baixa disponibilidade destas células continua a constituir a principal barreira à sua utilização. (9)

#### **5.4. Células estaminais somáticas não restritas**

As CESNR são células pluripotentes, que foram recentemente isoladas a partir do sangue do CU. (11) Estudos *in vitro* e *in vivo* têm determinado que estas células exibem uma elevada atividade proliferativa, assim como uma ampla capacidade de diferenciação em vários tipos de células das três camadas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme. (10,11,54,55)

As CESNR, enquanto células não hematopoiéticas, são consideradas por alguns autores como células progenitoras das CEM, (11) uma vez que também se podem diferenciar em células neuronais, ósseas, da cartilagem, sanguíneas, hepáticas e do músculo cardíaco. (10,12,56,57) Contudo, estas células não possuem capacidade de diferenciação adipogénica, pela forte expressão do inibidor de adipócitos DLK-1/PREF1. (58) À semelhança das CEM, as CESNR possuem uma baixa natureza imunogénica. (11,59) Esta propriedade, aliada à produção de citocinas essenciais à hematopoiese, como principal função das CESNR, (55) abre o caminho à utilização promissora destas células em áreas como a terapia celular e a tecnologia de reprogramação, que viabiliza a obtenção de CEPis. (10,11,60)

Ainda que diversos estudos tenham mostrado o potencial terapêutico das CESNR na doença hepática crónica (57), na regeneração nervosa periférica (59), na diminuição da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), na reparação após o enfarte do miocárdio, ou até como veículos para a terapia génica, a utilização futura destas células carece ainda de uma ampla investigação. (58,61)

### 5.5. Células estaminais *embryonic-like*

As CEEL são um tipo de CE de reduzidas dimensões, capazes de originar células das três linhas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme. (12,13) Podem ser isoladas a partir do sangue do CU, do sangue periférico e de órgãos adultos, como a MO e gónadas. (13,62) As CEEL, embora possam ser encontradas em tecidos adultos, expressam marcadores de células de desenvolvimento embrionário precoce, como CEE e células germinativas primordiais pluripotentes, (63) apresentando, porém, um maior potencial de diferenciação. (64)

As CEEL têm revelado, através de diversos estudos, ser capazes de sustentar o fenómeno de transdiferenciação, no qual certos tipos de CE adultas podem diferenciar-se em células típicas de órgãos ou tecidos diferentes da sua linhagem de origem, como é o caso da diferenciação de células derivadas da MO em células epiteliais pulmonares. (63)

A presença de CEEL no sangue periférico após enfarte do miocárdio, lesão por queimadura cutânea, acidente vascular cerebral e em indivíduos com doença de Crohn reflete a mobilidade inerente a estas células que, aliada à sua pluripotência, as torna potenciais candidatas para aplicação clínica na Medicina Regenerativa. (63,65) No entanto, o principal problema inerente ao uso das CEEL na Medicina Regenerativa é a sua quiescência e número limitado, já que a capacidade de expansão *in vitro* destas células é ainda muito limitada e a expansão *ex vivo* requer também uma melhor compreensão dos mecanismos que lhe são inerentes. (66)

## **6. Transplante de células estaminais**

A MO, sangue periférico e sangue do CU constituem importantes fontes de CEH para o tratamento de diversas patologias. (67) Perante quadros clínicos de leucemia ou outras doenças do sangue e dos sistemas metabólico ou imunitário, o transplante de CEH constitui uma terapia que permite salvar a vida de muitos doentes tratados de forma agressiva por radioterapia, quimioterapia e/ou imunoterapia. (68) Assim, sempre que o recurso exclusivo a terapias convencionais, como as referidas anteriormente, não é suficiente para alcançar a cura, o transplante de CEH surge como uma abordagem alternativa, que proporciona ao doente um tratamento altamente promissor no que concerne à probabilidade de cura. (67,68)

O transplante de CEH é um procedimento que se baseia na erradicação e substituição das CE da MO de funcionamento anómalo, por CE benignas, sendo que estas constituirão as células progenitoras da MO funcional e, conseqüentemente, permitirão o restabelecimento da hematopoiese. (67)

Existem dois tipos de transplante de CE hematopoiéticas: autólogo e alogénico. O transplante autólogo consiste na utilização de CE do próprio doente, enquanto o transplante alogénico recorre à utilização de CE de um dador geneticamente similar (relacionado ou não relacionado com o doente). (68–70) No caso do transplante alogénico são sempre preferíveis dadores relacionados, particularmente irmãos, visto o maior grau de histocompatibilidade entre o dador e o doente. (67) Uma vez que o sistema imunitário de cada indivíduo é constituído por diversas células que, em sinergia, visam protegê-lo contra agentes patogénicos, uma das suas funções prende-se com a capacidade de reconhecimento de um antigénio como íntegro ou estranho ao organismo. Os antigénios do Complexo Principal de Histocompatibilidade formam o complexo genético responsável por essa diferenciação que, na espécie humana, é designado por sistema de HLA. (71) Assim, o grau de histocompatibilidade é determinado pela proximidade entre o HLA do dador e do doente, daí que, tal como referido anteriormente, irmãos HLA-compatíveis sejam considerados dadores ideais para o transplante alogénico de CEH. (67,72) A compatibilidade genética do sistema HLA, entre indivíduos, constitui a maior barreira à transplantação de CE, o que significa que, quanto maior a compatibilidade entre o dador e o doente ao nível de HLA, menor o risco de rejeição do enxerto e de DECH. (67,68) Deste modo, o enxerto de CE do dador que constituirão a base do novo sistema imunológico do doente, idealmente livre de doenças, reconhecerá as células tumorais residuais do doente como estranhas, e iniciará um ataque imunológico, conhecido como efeito do enxerto contra o tumor. Por norma, os transplantes alogénicos são praticados em casos de leucemias, síndrome mielodisplásica, linfoma folicular e anemia aplástica. (67)

Genericamente, o processo de transplantação pode subdividir-se em 3 fases: pré-transplante, peri-transplante e pós-transplante. A fase de pré-transplante centra-se essencialmente na elegibilidade do doente para transplantação e na disponibilidade de amostras. (70) A fase de peri-transplante diz respeito à instituição do tratamento de condicionamento, caracterizado pela destruição das células tumorais, e posterior infusão de CE. (67,70) O tratamento de condicionamento visa, assim, induzir imunossupressão, permitindo alcançar um ponto de equilíbrio entre a prevenção da rejeição do enxerto e o risco de DECH, já que regimes de quimioterapia de alta dose diminuem, por um lado, o risco de

rejeição do enxerto e recaída, mas, por outro lado, aumentam a morbidade e o risco de DECH. (67) A intensidade do tratamento de condicionamento varia, sempre, em função da finalidade pretendida. O tratamento pode classificar-se em mieloablativo, sempre que se pretende destruir completamente a MO com quimioterapia de alta dose, ou em não mieloablativo, quando se procura induzir a mielossupressão, com regimes de baixa dose, sem, contudo, destruir por completo a MO. (67) A fase de pós-transplante visa, por fim, avaliar a reconstituição imunitária e permitir, se necessário, a administração de vacinas que confirmam proteção contra microrganismos oportunistas. (70) Contudo, a administração de vacinas só poderá ser feita quando o sistema imunitário do doente recuperar totalmente, o que, por norma, ocorre entre um a dois anos após o transplante de CEH. Vacinas inativadas são iniciadas 12 meses após o transplante, enquanto vacinas vivas atenuadas não poderão ser administradas até, pelo menos, 2 anos após o transplante, sendo algumas até contraindicadas na fase pós-transplante, como é o caso da vacina contra a varicela zoster. (67)

A resposta de cada indivíduo ao transplante de CEH é variável, já que sofre influência de um conjunto alargado de fatores, de que são exemplo a idade do doente e comorbilidades pré-existentes, o tipo de transplante, a fonte de CE, o grau de histocompatibilidade entre o HLA do dador e do doente (para transplantes alogénicos) ou, até, o tipo de profilaxia anti-infeciosa realizada. Deste modo, o tipo de complicações decorrentes do transplante de CE, bem como a sua gravidade, são também, necessariamente, distintas entre indivíduos. (67) Uma das complicações mais comuns é a infeção, particularmente, de origem fúngica e viral. Apesar do recurso à profilaxia anti-infeciosa, o risco de infeção no primeiro mês pós-transplante é significativamente elevado, devido ao regime de condicionamento e ao quadro de neutropenia. Normalmente, as infeções, durante este primeiro mês, manifestam-se sob a forma de bacteriemias gastrointestinais ou associadas a cateteres e de infeções fúngicas invasivas, como é o caso da aspergilose. Já a partir do primeiro mês, a suscetibilidade dos doentes transplantados é maior para agentes patogénicos virais, como Citomegalovírus, vírus *Epstein-Barr* ou Herpes vírus, e para infeções oportunistas, como pneumonia por *Pneumocystis jiroveci* e toxoplasmose por *Toxoplasma gondii*. (67)

Outras complicações, frequentemente observadas, são a rejeição do enxerto e a síndrome do enxerto, que muitos autores acreditam ser, na verdade, uma manifestação precoce da DECH aguda. A síndrome do enxerto é considerada sempre que os doentes desenvolvem, nas duas primeiras semanas após o transplante ou no momento do enxerto, a tríade erupção cutânea generalizada, edema periférico e/ou pulmonar e febre alta. (67) Tal como já foi referido, a DECH é outra das complicações mais temidas e decorrentes do transplante alogénico de CEH, podendo classificar-se em aguda ou crónica. (67,73,74) A DECH aguda decorre de um processo imunologicamente mediado, no qual as células T do dador, presentes no enxerto, atacam antígenos do doente transplantado, que reconhecem como estranhos, resultando em lesão tecidual significativa. (67) Os sistemas de órgãos mais afetados são, normalmente, o trato gastrointestinal, a pele e o fígado, (75) embora pesquisas recentes apontem também para complicações reprodutivas e neurológicas. (67) A prevenção da DECH pode ser feita com recurso a duas estratégias, usadas em combinação ou isoladamente, sendo elas a terapêutica imunossupressora e a manipulação do enxerto. Assim, agentes terapêuticos, como o metotrexato, micofenolato de mofetil e inibidores da calcineurina (tacrolimus ou ciclosporina) são usados em várias combinações, por vezes associados ainda à depleção de células T do enxerto do dador. (67) No que respeita à DECH crónica, esta surge associada a anomalias decorrentes do desenvolvimento do novo sistema imunitário. (76) Neste caso, as manifestações clínicas surgem sobretudo ao nível de órgãos como a pele,

mucosa oral, fígado e olho, (75) e os esteroides sistêmicos constituem a primeira linha terapêutica a adotar. (67)

## **6.1. Transplante de células estaminais da medula óssea**

A MO representou a única fonte de CEH durante mais de uma década, após o primeiro transplante de MO, realizado pelo médico hematologista E. Donnall Thomas, na década de 1950. (14,77) No entanto, a ausência, observada em muitos casos, de um número adequado de CEH recuperadas da MO, conduziu ao desenvolvimento de novas investigações (14) e, atualmente, o transplante mais frequentemente utilizado é feito a partir do sangue periférico. (78) A recolha de CE do sangue periférico requer sempre a administração prévia de fatores de crescimento hematopoiéticos, como o fator estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF), a fim de mobilizar CEH da MO para o sangue periférico, e conseguir, desta forma, aumentar significativamente o número de CE em circulação e contornar a limitação referida anteriormente. (14,78)

As CEH da MO são obtidas após perfuração, seguida de aspiração, na crista ilíaca posterior, crista ilíaca anterior ou esterno do dador ou do próprio doente (no caso do transplante autólogo), sendo este procedimento realizado em bloco cirúrgico e sob anestesia geral. (67,78) Neste sentido, a colheita de CE da MO apresenta-se como um processo complexo, invasivo, doloroso e de difícil disponibilidade, características essas que são ultrapassadas quando a colheita de CE é feita a partir de outras fontes, como é o caso do CU. (15,77,79,80) Para além disso, a obtenção de CE da MO requer hospitalização e anestesia do dador, o que não se verifica na obtenção de CECU, em que o processo de colheita pode ser realizado antes ou após a expulsão placentária e é indolor, tanto para a mãe, como para o bebé. (15) A dor e o desconforto do dador na fase pós-colheita, assim como o aumento da dificuldade de extração de CE da MO com o envelhecimento, à medida que a MO vermelha vai sendo substituída por tecido gorduroso, são obstáculos presentes na transplantação de CE da MO. (15,80)

## **6.2. Transplante de células estaminais do cordão umbilical**

Decorridos mais de 30 anos após o primeiro transplante de sangue do CU, realizado, em 1988, em França, numa criança com anemia de Fanconi, é cada vez maior o interesse nesta fonte não controversa de CE. (12) O sangue do CU é, atualmente, considerado uma valiosa fonte de CEH, com uma eficácia semelhante, ou até mesmo superior, à das células provenientes da MO, (12) e constitui uma potencial alternativa ao transplante de MO, em doentes sem dadores HLA compatíveis. (81)

Diversas vantagens associadas à utilização de CECU sobrepõem-se ao uso de CE provenientes da MO. (15) Entre essas vantagens, destaca-se a maior facilidade de obtenção, a maior tolerância a incompatibilidades com o HLA, conduzindo a uma menor incidência de DECH, bem como a ausência de questões técnicas e éticas que, inevitavelmente, estão presentes no transplante de CE da MO. (15,80–82)

Contudo, a quantidade de CE extraídas do CU constitui a principal limitação ao seu uso, podendo comprometer o sucesso da aplicação clínica, já que o número de células transplantadas é um dos principais fatores de recuperação e sobrevivência após o transplante. (12,82) Assim, diversas estratégias têm sido desenvolvidas no sentido de colmatar esta desvantagem, entre as quais se destacam a transplantação múltipla (consiste na infusão de várias unidades de sangue do CU), a expansão *ex vivo* de células CD34+, a aplicação direta de CE na MO, evitando a retenção celular noutros órgãos, como os pulmões e o fígado, e a co-transplantação de células do sangue do CU com CE provenientes de outras fontes (ex.: células CD34+ expandidas *ex vivo*, células CD34+ haploidênticas da MO ou CEM). (12) De facto, o sucesso do transplante hematopoiético é cerca de seis vezes superior, quando CEM do tecido do CU são co-transplantadas com CE do sangue do CU, já que poderá acelerar a reconstituição do sistema imunológico do doente transplantado. A rapidez da reconstituição imunológica é medida pela contagem de leucócitos (células CD45+) no sangue periférico, após o transplante e constitui um fator determinante na sobrevivência do doente, que depende, por sua vez, de fatores como o número de CE transplantadas, a fonte das mesmas e o surgimento da DECH, sendo esta última inferior quando se utiliza concomitantemente CE do sangue e tecido do CU. (1)

O transplante hematopoiético do CU constitui assim, não só uma das terapias disponíveis para o tratamento de doenças hematológicas, em que se torna necessário regenerar o sistema sanguíneo e imunitário, como também uma fonte de células para a Medicina Regenerativa. (1,12) As principais vantagens e desvantagens inerentes ao seu uso, face ao transplante de CE da MO, são apresentadas na Tabela 2.



Tabela 2 – Comparação das vantagens e desvantagens inerentes ao transplante de células estaminais do cordão umbilical e da medula óssea. (Adaptada de 1,12,15,79–83)

Transplante de células estaminais		
	Cordão umbilical	Medula Óssea
<b>Vantagens</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Processo de colheita não invasivo e indolor;</li> <li>• Ausência de risco cirúrgico e de qualquer risco para a mãe e para o bebê;</li> <li>• Facilidade de obtenção e disponibilidade da amostra (CU é descartado após o parto);</li> <li>• Maior tolerância a incompatibilidades HLA;</li> <li>• Menor tempo de espera para a realização do transplante;</li> <li>• Menor probabilidade de incidência de DECH;</li> <li>• Menor risco de transmissão de infecções por vírus latentes;</li> <li>• CE ainda não expostas a fatores ambientais carcinogênicos;</li> <li>• CE mais primitivas, quer a nível imunológico, quer de desenvolvimento, e com maior potencial proliferativo e regenerativo;</li> <li>• Facilidade de caracterização, criopreservação e armazenamento de amostras, durante anos, sem que ocorra perda da viabilidade celular.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior número de CE por unidade de volume, no momento da colheita;</li> <li>• Possibilidade de múltiplas aspirações;</li> <li>• Maior rapidez na reconstituição do sistema imunitário, após o transplante.</li> </ul>
<b>Desvantagens</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor número de CE por unidade de volume, no momento da colheita;</li> <li>• Maior demora na reconstituição do sistema imunitário, após o transplante.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Processo de colheita invasivo e complexo;</li> <li>• Riscos para o dador associados à hospitalização e anestesia;</li> <li>• Dor e desconforto do dador, após a colheita;</li> <li>• Difícil disponibilidade;</li> <li>• Maior tempo de espera para a realização do transplante;</li> <li>• Necessidade de elevada compatibilidade HLA;</li> <li>• Maior probabilidade de incidência de DECH;</li> <li>• CE já expostas a fatores ambientais carcinogênicos;</li> <li>• Dependente das condições clínicas do indivíduo.</li> </ul>

## **7. Criopreservação de células estaminais do cordão umbilical**

Contrariamente ao transplante alogénico de CE, o transplante autólogo, particularmente de CECU, requer sempre a submissão destas células a um processo de criopreservação, uma vez que o momento de colheita e utilização das CE não é coincidente. (84) Assim, o recurso à técnica de criopreservação permite contornar a disponibilidade limitada do CU no curto período de tempo, imediatamente, após o parto. (85)

A criopreservação pode, então, definir-se como uma técnica que possibilita a preservação não só de células, mas também de tecidos e outras estruturas biológicas vivas, a baixas temperaturas e por longos períodos de tempo. (86,87) Apesar da longa experiência de alguns laboratórios no processamento de CE, ainda hoje não existe um consenso sobre o método universalmente aceite para a criopreservação de CECU, nem sobre o tempo máximo de armazenamento destas células. (84,88) A escolha de um protocolo adaptado a cada processo de criopreservação depende sempre do tipo de amostra envolvida, isto é, do tipo de componente que está presente no mesmo fragmento de tecido do CU: vasos sanguíneos, Geleia de Wharton ou um componente celular. (85,88) Por isso, cada laboratório deve sempre desenvolver o seu próprio protocolo, adaptado a cada situação, e implementar processos validados, sob um sistema de qualidade em conformidade com padrões, normas e regulamentos pertinentes, desenvolvidos por organizações profissionais e autoridades competentes. (84) No entanto, estudos recentes têm demonstrado que a viabilidade das CECU criopreservadas é assegurada por um período de tempo de cerca de 25 anos. (87)

A utilização terapêutica das CECU várias semanas, meses ou anos após a sua colheita, requer a adoção de um processo de criopreservação delicado e rigoroso, a fim de proteger e manter as propriedades terapêuticas destas células, minimizando a sua deterioração. (84) Para tal, o processo de criopreservação não deve recorrer a procedimentos simples de congelamento e descongelamento das amostras, mas sim a procedimentos onde a sua velocidade seja rigorosamente controlada, com o intuito de evitar a formação de cristais de gelo, choque osmótico ou quaisquer danos na membrana das células que conduziriam à sua morte. O uso atual de agentes crioprotetores, de que são exemplos o dimetilsulfóxido (DMSO), o glicerol e o propilenoglicol, assim como de equipamentos de controlo da temperatura tem contribuído, fortemente, para o progressivo sucesso do processo de criopreservação observado nos últimos anos. (86,89) Assim, a eficácia de obtenção de CECU viáveis, após criopreservação, é inevitavelmente influenciada por diferentes fatores, nomeadamente, composição do meio crioprotetor, processo de congelamento e descongelamento, período de armazenamento e protocolo utilizado para o isolamento celular. (85,90) O isolamento de CECU é considerado, por alguns autores, vantajoso, face à criopreservação do próprio tecido do CU, uma vez que permite o armazenamento de amostras totalmente caracterizadas e controladas, prontas a utilizar numa situação clínica futura. (88) Otimizar e padronizar o processo de criopreservação constitui, assim, o ponto chave para uma utilização terapêutica futura, bem-sucedida, de CECU viáveis. (86,89)

## **7.1. Metodologia intrínseca**

O conhecimento aprofundado e contínuo das propriedades físicas e químicas que fundamentam a ciência conhecida por criogenia, assim como das características das células e/ou tecidos submetidos a esse processo, é necessário para uma criopreservação bem-sucedida de CECU e futura aplicação clínica das mesmas. (86)

Não menos essencial é a definição prévia das etapas e requisitos que devem estar presentes ao longo de todo o processo de criopreservação, desde a colheita de CECU até à sua utilização, e a identificação dos pontos críticos, suscetíveis de controlo durante o processo. Cada laboratório e/ou banco de CECU é responsável por identificar os pontos críticos do processo e proceder ao seu controlo, pois a segurança e eficácia das amostras jamais poderá estar comprometida. O posterior controlo e revisão do processo, através da análise meticulosa dos resultados obtidos, deve constituir igualmente uma prática observada, contribuindo significativamente para a melhoria contínua do processo de criopreservação de CECU. (84)

Todas as etapas intrínsecas ao processo de criopreservação são, então, apresentadas seguidamente.

### **7.1.1. Decisão de doação**

A decisão de doação de CECU é sempre uma decisão pessoal, que deve assentar na recolha de informação fidedigna, obtida por meio de aconselhamento junto de profissionais e autoridades de saúde. (91) Neste sentido, o destino do CU, após o parto, é sempre fruto da pretensão dos pais da criança. Os pais da criança podem optar por praticar uma decisão altruísta, através da qual as CECU são doadas a um banco público, podendo posteriormente ser utilizadas por qualquer doente que delas necessite. No entanto, os pais da criança podem igualmente optar por praticar decisões não altruístas, elegendo, assim, a conservação das CECU num banco privado, no qual as mesmas são armazenadas para uso exclusivo da criança em questão ou de um familiar, ou podem, somente, optar por rejeitar o CU após o nascimento. (91,92)

A dádiva de CECU deve ser sempre precedida do consentimento informado, assinado pelos pais da criança, de modo a que sua decisão seja sempre impulsionada pela consciência dos riscos e benefícios inerentes ao processo. Assim, o esclarecimento acerca do uso pretendido das CECU (utilização com fins terapêuticos, como é o caso do transplante autólogo ou alogénico, ou utilização sem fins terapêuticos, de que é exemplo a investigação científica) deve estar sempre presente. Igualmente a cedência de informação respeitante ao próprio processo de criopreservação, ao armazenamento de CECU e ainda à gestão de informação e dados pessoais, privados e confidenciais, torna-se um requisito imprescindível na tomada de decisão. (93) Apesar da relevância da cedência de informação aos pais, aquando da sua decisão de doação de CECU, o conhecimento e consciencialização dos pais acerca desta temática é ainda hoje relatado como baixo e, por isso, as suas escolhas são muitas vezes desprovidas de influência científica. (92) No entanto, a falta de conhecimento por parte dos leigos é também encorajada pela falta de conhecimento dos próprios profissionais de saúde,

nomeadamente, do grupo médico, o que torna ambos os grupos vulneráveis a estratégias de *marketing*. (94)

Nos bancos públicos, a decisão de doação de CECU nem sempre é provida de viabilidade, pois existem critérios de elegibilidade que, por vezes, não são cumpridos e que tornam acrescidos os riscos dos doadores e doentes transplantados. (91) Por esta razão, são sempre solicitadas amostras de sangue materno, entre 7 dias antes e 7 dias após o nascimento da criança, a fim de averiguar a esterilidade microbiana e a presença de marcadores infecciosos (ex: Vírus da Hepatite B e C e Vírus da Imunodeficiência Humana) na amostra de CU recolhida. (91,93)

### **7.1.2. Colheita e transporte do local de recolha para o Banco de Criopreservação**

A fim de minimizar o risco de contaminação de CECU, a sua colheita deve ser sempre realizada sob condições asséticas, em instalações, onde a introdução, produção e retenção de partículas e microrganismos seja mínima. A colheita de CECU em ambiente assético assume-se relevante, uma vez que a contaminação da amostra na fase de colheita compromete todo o processo sequencial, pela impossibilidade de aplicar, posteriormente, métodos de esterilização à mesma. (95)

A colheita, quer de sangue contido no tecido vascular do CU, quer do próprio tecido conjuntivo do CU (Geleia de Wharton) é indolor e isenta de riscos para a mãe e para o neonato (96,97), devendo ser realizada imediatamente após a clampagem do CU, com o intuito de evitar a coagulação sanguínea e maximizar o volume de colheita. (98) A clampagem do CU e a posterior colheita de sangue ou tecido do mesmo devem, assim, ser realizadas num momento bem definido, uma vez que os vasos sanguíneos do CU tendem a colapsar, como consequência da perda de pressão sanguínea e da alteração da temperatura. A consequência imediata da oclusão vascular é a coagulação do sangue do CU, o que dificulta, naturalmente, a sua recolha. (93) Para além da coagulação sanguínea, a possível contaminação da amostra constitui outro ponto crítico inerente ao momento da sua colheita. Ainda que a colheita de sangue e tecido do CU seja um procedimento simples e rápido, é frequente, sobretudo num parto vaginal, o contacto da amostra com fluidos vaginais e resíduos intestinais, conduzindo assim à sua contaminação. (93,98) Por isso, a recolha de CECU é um procedimento onde o tempo e a assepsia são fatores que contribuem de forma relevante para a recolha, com sucesso, de uma amostra viável.

A recolha de sangue do CU é feita através da veia umbilical, podendo ser realizada antes ou após a expulsão da placenta, designada, respetivamente, por colheita *in utero* ou *ex utero*. (97,98) A colheita *in utero* tem sido considerada preferencial, uma vez que possibilita a obtenção de volumes de sangue ligeiramente superiores e de um maior número de células nucleadas totais (CNT) face à técnica de colheita *ex utero*. (97)

O método padrão *in utero* baseia-se na recolha de sangue do CU, com recurso a um sistema de colheita fechado, a fim de reduzir o risco de infeção e contaminação do fluido fetal materno. O CU é alvo de uma punção venosa, nomeadamente, na veia umbilical, com recurso a uma agulha ou a qualquer outro mecanismo de sucção, e o sangue é drenado para uma bolsa de colheita estéril, à qual a agulha se encontra conectada. É importante que a bolsa de

colheita estéril se encontre numa posição inferior, comparativamente ao ponto em que está a ser feita a colheita, de modo a favorecer o fluxo sanguíneo por gravidade. (97,98) O procedimento é realizado em, aproximadamente, 5 a 10 minutos e diversos fatores podem influenciar o volume de sangue recolhido. A presença de hipertensão materna, a gestação múltipla ou o parto prematuro são exemplos de fatores influentes na redução do volume sanguíneo do CU; já a indução ou o prolongamento do trabalho de parto e a gestação única são fatores que contribuem para um aumento do volume de sangue do CU recolhido. (97)

Por outro lado, a colheita de sangue do CU, com recurso a uma técnica *ex utero*, requer a presença de pessoal treinado e devidamente qualificado, bem como de uma sala segregada das restantes. O sangue é colhido para uma bolsa de colheita estéril, o mais rápido possível após a expulsão da placenta, sendo essa recolha feita sob influência da gravidade, uma vez que a placenta é suspensa num suporte apropriado. Embora os recursos e os custos associados a esta técnica sejam superiores aos observados numa colheita *in utero*, e haja possibilidade acrescida de obtenção de um menor volume de sangue do CU, a redução da ocorrência de não conformidades inerentes ao processo está diminuída. (97,98)

A colheita de sangue ou tecido do CU deve ser feita o mais rapidamente possível após o nascimento. No entanto, a segurança materna e do neonato nunca devem estar comprometidas e situações que, por si só, sejam comprometedoras, como é o caso do parto prematuro ou de complicações médicas ou obstétricas maternas graves, devem ditar a contra-indicação de recolha de CECU. (97)

Após a colheita de sangue do CU e a fim de prevenir fenómenos de coagulação sanguínea, adiciona-se, frequentemente, à amostra, contida na bolsa de colheita estéril, uma solução anticoagulante de citrato ácido dextrose ou de citrato fosfato dextrose. (98) No caso da colheita de tecido do CU, o seu acondicionamento é feito em meio de cultura basal, contendo antibióticos que evitem o crescimento bacteriano. (95)

A amostra do CU colhida com sucesso deve, posteriormente, ser transportada para o laboratório e o seu processamento e criopreservação devem ser realizados dentro do período de tempo máximo de 48h. (98) Desde a colheita e até ao processamento da amostra é feita a monitorização contínua de todos os fatores que possam afetar a viabilidade das CECU, nomeadamente, tempo, humidade, pH, níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> e temperatura, (93,98) podendo esta última variar entre 2°C e 24°C durante o transporte, de acordo com as condições pré-estabelecidas. (84) Assim, o transporte das amostras recolhidas, para laboratórios de processamento de CECU, é sempre feito segundo condições controladas e registadas, que confirmem segurança e qualidade às amostras de sangue ou tecido do CU. (93) As amostras transportadas devem, ainda, ser acompanhadas por toda a documentação relevante, como é o caso do consentimento informado e da descrição do produto, e devem, também, ser identificadas de forma inequívoca, com recurso a rótulos que apresentem códigos de barras exclusivos para cada amostra. Os rótulos devem incluir informação pertinente (por exemplo: o local de colheita e de destino da amostra e a entidade responsável pela mesma), a fim de assegurar, sempre, a rastreabilidade de todas as amostras. (84,95)

### **7.1.3. Processamento**

Após a chegada das amostras de sangue ou tecido do CU ao Banco de Criopreservação, inicia-se o processamento das mesmas, recorrendo a métodos parcialmente automatizados. (93)

Numa primeira fase, é feita a desinfecção da superfície da bolsa de recolha da amostra e esta é encaminhada para uma sala limpa de classe B, que reúne condições assépticas, pelo que a qualidade do ar é rigorosamente controlada, segundo requisitos pré-definidos. (93,95,99)

O processamento de sangue do CU baseia-se na seleção das células de interesse, podendo ser realizado com recurso a dois métodos. (98) Um dos métodos baseia-se na redução do volume da amostra, por redução dos glóbulos vermelhos. Deste modo, é então feita a sedimentação dos eritrócitos e posterior centrifugação, o que permite a obtenção de uma suspensão rica em células mononucleadas, na qual se encontram as CE de interesse para o processo de criopreservação. (93,98) Esta suspensão é formada por três diferentes frações: na mais pequena, denominada *buffy coat*, encontram-se os leucócitos e as CE que se pretendem criopreservar para futura utilização clínica; as restantes duas frações são formadas por plasma e eritrócitos, sendo uma parte destas frações igualmente armazenada para a realização de eventuais testes laboratoriais necessários. (93,100) O procedimento de redução do volume da amostra, por triagem dos eritrócitos, é essencial, uma vez que possibilita a racionalização do espaço de armazenamento, bem como a utilização de menores quantidades de agentes crioprotetores. Os eritrócitos demonstraram, ainda, afetar negativamente a viabilidade e a potência celular, após o descongelamento das amostras, pela indução de citotoxicidade, o que torna a sua remoção crucial. (93,98) O outro método baseia-se, não na redução de glóbulos vermelhos, mas na remoção de plasma e parte celular, nomeadamente, leucócitos e eritrócitos, sendo as CE isoladas e posteriormente criopreservadas. (98)

Embora o processamento celular por redução plasmática seja economicamente mais favorável do que por redução dos glóbulos vermelhos, o mesmo não se verifica em relação ao armazenamento e processo de descongelamento das amostras, onde os custos e a complexidade dos processos são maiores no processamento por redução plasmática. (93,98) Apesar disso, quando o descongelamento e a lavagem das amostras são realizados em condições otimizadas, o método de processamento por redução plasmática possibilita a obtenção de bons rendimentos, com um número igual ou superior de unidades formadoras de colónias, CNT e células CD34+, o que favorece a sua maior eficácia no tratamento de algumas doenças, como a  $\beta$ -talassemia. (93) Contudo, a maioria dos Bancos de Criopreservação recorre ao método de processamento por redução dos glóbulos vermelhos, por ser, de um modo geral, economicamente mais eficiente (98)

À semelhança do sangue do CU, também as amostras de tecido do CU são submetidas a um processamento, com o intuito de selecionar as células de interesse e eliminar outras que possam interferir negativamente com o procedimento de criopreservação. No caso do tecido do CU, a seleção das células de interesse pode ser realizada recorrendo à centrifugação por gradiente de concentração ou a métodos imunológicos, quando se pretende uma seleção mais rigorosa, dos quais são exemplo a separação celular imunomagnética ou ativada por fluorescência. (93,99)

Paralelamente, e ao longo de todo o processo, as amostras de sangue e de tecido do CU devem ser submetidas a um rigoroso controlo de qualidade, que inclui a realização de testes de esterilidade, contagem de CNT (mínimo de  $800 \times 10^6$  CNT antes da criopreservação), células CD34+ e verificação da viabilidade e potência celular. (93,98,101) No caso das amostras de sangue do CU, a determinação do grupo sanguíneo e análises virológicas e bacteriológicas, prévias ao processo de criopreservação, devem igualmente ser realizadas, a fim de possibilitar o despiste de uma eventual contaminação da amostra. (100,101)

#### **7.1.4. Criopreservação**

O processo de criopreservação baseia-se no armazenamento de CECU, em azoto em fase líquida ou de vapor, permitindo manter a viabilidade celular ao longo de vários anos. A metodologia intrínseca ao processo de criopreservação tem evoluído ao longo do tempo e, atualmente, o sucesso do processo está dependente de diversos fatores, nomeadamente, concentração celular, agentes crioprotetores, temperatura e taxa de congelamento. (84,93)

- Concentração celular

A concentração de CE determina a concentração de agente crioprotetor utilizado durante o processo de criopreservação, pelo que concentrações elevadas de CECU foram, inicialmente, identificadas como uma possível causa de perda celular, resultante da toxicidade de agentes crioprotetores. A redução do espaço de armazenamento requerido e a minimização dos custos são também fatores que contribuíram para a limitação da concentração de CECU criopreservadas. (84) Definiu-se, como concentração celular aceitável mínima, o valor de  $2,5 \times 10^7$  CNT/ Kg peso corporal do doente transplantado. (93) No entanto, estudos recentes indicam que somente 10% das amostras criopreservadas contêm um número de células suficientes para a transplantação de um adulto ou de um indivíduo mais pesado. Por isso, a fim de prevenir a lenta recuperação hematopoiética, o enxerto deficiente ou a mortalidade relacionada com o transplante, as limitações de dose celular são ultrapassadas com recurso a transplantes duplos de CECU, os quais utilizam CECU de dois dadores compatíveis. (93)

- Agentes crioprotetores

Durante o processo de criopreservação são diversas as barreiras que as CE necessitam de ultrapassar a fim de evitar a ocorrência de lesões, entre as quais se destacam: mudança de fase da água a baixa temperatura, com consequências no ambiente intra e extracelular; velocidade de realização do procedimento de criopreservação que pode afetar reações físico-químicas e biofísicas e rutura osmótica causada por solutos concentrados. Por essa razão, a adição de substâncias, denominadas agentes crioprotetores, à suspensão de CECU constitui uma prática frequente, já que estes agentes minimizam a ocorrência dos efeitos mencionados anteriormente e favorecem a viabilidade da amostra.

Os agentes crioprotetores são substâncias, geralmente fluidas, adicionadas à amostra imediatamente antes do congelamento e que se podem classificar em dois tipos principais, no que concerne à capacidade de permeação da membrana celular: permeáveis à membrana

celular, como o DMSO e o glicerol, e não permeáveis à membrana celular, como o 2-metil-2,4-pentanodiol, vários polímeros e açúcares. (86)

Apesar dos avanços notáveis no desenvolvimento de novos crioprotetores (ex: trealose), o DMSO continua a ser o agente crioprotetor mais utilizado, pelo seu baixo custo e nível de toxicidade, já que a sua adição à amostra é acompanhada de outros aditivos que contribuem para a redução da toxicidade do DMSO, designadamente, hidroxietilamida e dextrano. (84,86) No entanto, concentrações de DMSO superiores a 1%, por períodos de tempo superiores a 30 minutos, a 37°C, têm evidenciado uma diminuição da taxa de sobrevivência das CE e um aumento da diferenciação celular por metilação do DNA, razão pela qual o DMSO deve ser removido logo após o descongelamento das amostras, com o intuito de minimizar efeitos adversos nos indivíduos transplantados. (86,93) A concentração final de DMSO mais frequentemente utilizada é de 10%, sendo que o uso de concentrações inferiores diminui a toxicidade celular, mas também poderá comprometer a recuperação de CE viáveis. (84) Deste modo, a concentração de qualquer substância crioprotetora deve ser sempre otimizada, de modo a alcançar-se a melhor taxa de sobrevivência celular possível. (86,93)

O crioprotetor DMSO atua por redução da concentração eletrolítica da solução residual presente dentro e à volta das CE, a qualquer temperatura, o que se traduz numa redução da formação de gelo intracelular e, conseqüentemente, na prevenção do dano das CE, devido à desidratação que o gelo extracelular, formado durante o congelamento, poderia causar. (84,86) Atualmente, embora o DMSO seja ainda considerado o crioprotetor preferencial, estudos recentes demonstraram vantagem na utilização do açúcar trealose, face ao padrão DMSO. A trealose a 1M demonstrou uma crioproteção melhorada das células CD34+, mantendo a sua viabilidade e capacidade de diferenciação após descongelamento. (102)

- Temperatura

A temperatura é um fator determinante no sucesso de armazenamento das amostras criopreservadas. A definição do perfil de temperatura deve assegurar a manutenção da viabilidade das CECU, durante todo o período de tempo de armazenamento. Sabe-se que, quanto menor for a temperatura, maior será a capacidade de armazenamento das CECU, tendo sido considerada a temperatura de -136°C (temperatura de transição vítrea da água) como o ponto de referência, a partir do qual a atividade biológica da água é interrompida. Neste sentido, as amostras de sangue ou tecido do CU devem ser sempre armazenadas a temperaturas inferiores a -136°C, o que poderá ser alcançado com recurso a três alternativas diferentes.

As amostras armazenadas em azoto líquido necessitam de ser submetidas a -196°C, uma vez que essa corresponde à temperatura de ebulição do azoto líquido. Porém, o azoto líquido é considerado um fator de risco para a eventual contaminação das amostras, pelo que, alternativamente, as amostras podem ser armazenadas em azoto na fase de vapor, resultante da evaporação do azoto em fase líquida. Nesse caso, as amostras necessitam de ser submetidas a uma temperatura inferior a -150°C, conseguindo-se ultrapassar o risco de contaminação inerente ao armazenamento em azoto líquido e alcançando-se uma maior estabilidade. (84,103) A submissão das amostras a uma temperatura de -150°C pode ainda ser feita quando se recorre ao uso de congeladores elétricos, que apresentam a vantagem de não necessitarem do uso de azoto. Contudo, em casos de falha elétrica não constituem a



melhor alternativa, sendo, então, a amostra submetida a temperaturas compatíveis com o armazenamento em tanques de azoto. (84,103)

- Taxa de congelamento

A taxa de congelamento constitui um fator crítico na manutenção da viabilidade celular, pelo que desvios da taxa ideal de congelamento resultam em efeitos prejudiciais para as CE. (104) A taxa de congelamento ideal resulta da interação e equilíbrio entre dois efeitos: efeito da solução e formação de gelo intracelular, decorrentes, respetivamente, de uma taxa de congelamento mais lenta e de uma taxa de congelamento mais rápida do que a ideal. (105)

Sempre que as CE experimentam o efeito da solução sofrem lesões resultantes do efluxo de água e da contração celular, em resposta à elevada concentração de soluto no meio. Nesse caso, a permeabilidade das CE à água é inferior à ideal, pelo que as células experimentam lesões associadas a uma taxa de congelamento mais lenta e que tendem a acumular-se, com o aumento do tempo de exposição a concentrações prejudiciais de soluto. Inversamente, quando a taxa de congelamento é mais rápida do que o seu valor ideal, a permeabilidade das CE não permite um movimento compensatório de água para fora das células e, por isso, a água acumulada no meio intracelular é transformada em gelo, de modo a restabelecer-se o equilíbrio entre o meio intra e extracelular. (104,105)

Embora esteja bem definido na literatura que a taxa de congelamento ótima, responsável por assegurar a manutenção da viabilidade celular, é de 1 a 2,5°C/ minuto (103,104), o congelamento das amostras pode ser realizado a taxa controlada ou não controlada. (106)

O congelamento a taxa controlada, para além de possibilitar adequar o perfil de temperatura ao tipo de células, apresenta ainda a vantagem de requerer baixas concentrações de crioprotetores, minimizando a toxicidade inerente aos mesmos. (107) No caso das CECU, o congelamento a taxa controlada é considerado padrão, sendo as CE congeladas a uma velocidade de 1-2°C/ minuto, até à temperatura aproximada de -40°C e, seguidamente, congeladas a uma velocidade de 3-5°C/ minuto, até à temperatura de -120°C. (106) Contrariamente, o congelamento a velocidade não controlada implica a submissão da amostra a um arrefecimento até -4°C, seguido da sua colocação num congelador a -80°C, ou em azoto em fase líquida, e posterior transferência para o local de armazenamento final. (98,106)

Genericamente, o processo de criopreservação inicia-se com a adição de crioprotetores à suspensão de células hematopoiéticas ou ao tecido que contém as CE de interesse, seguindo-se o congelamento da mistura até uma temperatura muito baixa. A amostra final congelada é, posteriormente, transferida para um recipiente contendo azoto líquido ou em fase de vapor, no qual permanecerá até manutenção da sua viabilidade ou necessidade de utilização para tratamento. (98,100)

No que respeita ao congelamento propriamente dito da amostra, este poderá ser feito com recurso ao método de congelamento lento ou de vitrificação, ou simplesmente após a adição do agente crioprotetor, sendo tais métodos explicitados seguidamente. (86,93,106) Independentemente do método utilizado, as CECU congeladas são submetidas a um rigoroso controlo de qualidade, cerca de 72h após o congelamento, que permite avaliar a sua viabilidade e ausência de contaminação. (103,106)

#### **7.1.4.1. Método de congelamento por adição de crioprotetor DMSO, após redução de glóbulos vermelhos**

Após processamento da amostra, consegue-se isolar um volume de sangue do CU (correspondente ao *buffy coat*) de aproximadamente 20 ml, ao qual se adicionam 5 ml de DMSO a 50%. A suspensão celular é posteriormente congelada. (93,98)

#### **7.1.4.2. Método de congelamento por adição de crioprotetor DMSO, após redução plasmática**

No caso deste método, após processamento da amostra, conseguem-se isolar somente as CE que são, então, congeladas na presença de DMSO a 10%. (93,98)

#### **7.1.4.3. Método de congelamento lento**

Como o próprio nome sugere, o método de congelamento lento baseia-se na submissão das amostras a um plano de descida gradual da temperatura, no qual a taxa de arrefecimento é, tipicamente, de 1°C por minuto, na presença de uma concentração inferior a 1,0M de agente crioprotetor e utilizando um aparelho congelador de alto custo, com controlo da taxa de arrefecimento. (86,103) Perante o arrefecimento lento a que as amostras são submetidas, ocorre um efluxo rápido de água intracelular, o que previne a formação de cristais de gelo que levariam à destruição das CE. O primeiro passo deste método é a adição de um agente crioprotetor à amostra, o qual substituirá a água intracelular que sofreu efluxo, reduzindo, assim, o dano celular e possibilitando o ajuste da taxa de arrefecimento. O ajuste da taxa de arrefecimento é sempre função da permeabilidade da membrana celular, já que as células apresentam diferentes capacidades de movimentar a água através da membrana plasmática, o que significa que o sucesso deste método de congelamento depende sempre do tipo celular.

Embora o baixo risco de contaminação durante os procedimentos e a reduzida exigência de técnicas de manipulação sejam aspetos vantajosos, a destacar, neste método de congelamento das amostras de CECU, há que referir que a possibilidade de formação de gelo extracelular pode diminuir o sucesso do método. (86,108)

#### **7.1.4.4. Método de vitrificação**

Alternativamente ao método de congelamento lento, as amostras podem ser congeladas por um método de vitrificação, que consiste na solidificação de uma solução, sem cristalização e crescimento de gelo. Este fenómeno somente é alcançado quando os solutos no sistema são suficientemente concentrados, ou o sistema é arrefecido suficientemente rápido, de modo a que o aumento da viscosidade iniba a cristalização e impeça o crescimento de gelo. À medida que o arrefecimento progride, a viscosidade do meio continua a aumentar, até que o

movimento de todas as moléculas seja interrompido e o sistema sofra vitrificação, ou seja, exiba as propriedades de um sólido, mas mantenha a estrutura de um líquido. (105)

Assim, o congelamento de CECU, pelo método de vitrificação, pode definir-se como a passagem direta das amostras do estado aquoso para um estado vítreo, após exposição ao azoto líquido. Este método requer, então, a submissão das amostras a altas concentrações de agente crioprotetor (proporção de 40 a 60% peso/ volume), seguido de um rápido arrefecimento, a fim de evitar a formação de cristais de gelo. O equilíbrio entre três fatores fundamentais determina o sucesso deste método: viscosidade da amostra, taxa de arrefecimento e aquecimento e volume da amostra. (86,108)

O método de vitrificação pode classificar-se em dois tipos: vitrificação de equilíbrio, no qual misturas de substâncias crioprotetoras são adicionadas à amostra, em concentrações suficientes que evitem a formação de gelo, e vitrificação de não-equilíbrio, que recorre à utilização de taxas de congelamento extremamente altas, com a exigência de menores concentrações da mistura de agentes crioprotetores e, por isso, menos tóxicas. (86,105)

A elevada taxa de sobrevivência celular, decorrente da minimização do risco de formação de gelo intracelular e consequentes danos, durante o processo de congelamento, destaca-se como a grande vantagem deste método. (86,105) Além disso, neste método as amostras são expostas a agentes crioprotetores por períodos de tempo mais curtos, do que seriam no caso do congelamento lento convencional. Tal facto contribui para que seja dispensada a existência de uma taxa ótima de congelamento da amostra, sendo apenas requerida uma taxa de arrefecimento suficiente que evite a formação de cristais, o que, consequentemente, implica a necessidade de equipamento caro e complexo. (105) Deste modo, os custos e a maior complexidade de técnicas de manipulação, aliados ao maior risco de contaminação da amostra por agentes patogénicos constituem as limitações do método de vitrificação. (86,108)

Embora o método de congelamento lento a taxa controlada seja, para muitos laboratórios, indutor de bons resultados, estudos recentes têm demonstrado que o congelamento rápido das amostras, sob a forma de vitrificação, constitui um método tão ou mais eficaz na manutenção da viabilidade celular. (107)

As características diferenciadoras dos métodos de congelamento lento e de vitrificação encontram-se resumidas na Tabela 3.

Tabela 3 – Comparação dos métodos de congelamento lento e vitrificação (Adaptado de 86)

Característica	Método de congelamento	
	Congelamento lento	Vitrificação
Tempo requerido	Mais de 3h	Rápido, menos de 10 minutos
Custo	Elevado (necessário congelador)	Baixo (sem necessidade de maquinaria especial)
Volume de amostra (µl)	100 – 250	1 – 2
Concentração de crioprotetor	Baixa	Alta

Risco de danos celulares por congelamento (incluindo formação de cristais de gelo)	Alto	Baixo
Viabilidade pós-descongelamento	Alta	Alta
Risco de toxicidade do crioprotetor	Baixo	Alto
Tipo de sistema	Sistema fechado	Sistema fechado e aberto
Potencial contaminação com agentes patogênicos	Baixa	Alta
Manipulação	Fácil	Difícil

### **7.1.5. Descongelamento e lavagem**

O descongelamento das CECU criopreservadas pode ser feito com recurso a diversas técnicas, sendo que a técnica padrão utilizada baseia-se no aquecimento da amostra, em banho-maria, a 37°C, até que todos os cristais de gelo se dissolvam. (102,106) Posteriormente, avalia-se a viabilidade e a capacidade de diferenciação das CECU descongeladas, sendo o teste de exclusão do corante azul de tripano, um dos testes usados para proceder a essa avaliação. A percentagem de células viáveis após o descongelamento é normalizada para células não criopreservadas (100% de viabilidade), através da seguinte equação:  $\text{viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{número de células recuperadas após descongelamento} \times 100}{\text{número de células não criopreservadas}}$ . (102)

Uma vez que se assume que o agente crioprotetor mais utilizado (DMSO) no processo de criopreservação apresenta toxidade para as CECU, deve realizar-se o procedimento de lavagem das amostras, após o seu descongelamento, a fim de reduzir a quantidade de DMSO presente na amostra e que é proporcional ao grau de toxidade deste agente. (93,106)

Embora existam dispositivos automatizados de lavagem celular, o procedimento de lavagem padrão, atual, é manual. Este procedimento baseia-se na diluição, em duas fases, das CECU descongeladas com uma solução de albumina de soro humano a 2,5% e dextrano 40 a 5%, à qual se segue uma centrifugação, a 10°C, durante 10 minutos. Posteriormente, é removido o sobrenadante e novamente adicionada a solução de albumina e dextrano, até que se obtenha uma concentração final de DMSO inferior a 1,7%. Depois de descongelada e lavada, a amostra de CECU é acondicionada em recipientes apropriados, a fim de se prevenir a sua contaminação microbiológica, já que esta poderá ser altamente fatal para o recetor do transplante, severamente imunodeprimido. A amostra deverá ser transplantada o mais rapidamente possível, após o descongelamento e lavagem, sendo, no entanto, realizada uma nova avaliação da contaminação microbiológica imediatamente antes da sua infusão. (106)

### 7.1.6. Transporte desde o Banco de Criopreservação até ao local de utilização

Analogamente ao transporte da amostra de CECU desde o local de recolha até ao Banco de Criopreservação, também o transporte Banco de Criopreservação – local de utilização deve ser feito de forma cuidada, em recipiente apropriado. A temperatura deverá ser sempre monitorizada, com recurso a uma sonda de registo contínuo e os dados deverão ser analisados periodicamente. (84)

De forma resumida, todas as etapas inerentes ao processo de criopreservação de CECU encontram-se esquematizadas na Figura 6.

Decisão de doação	Decisão pessoal e consciente de doação de CECU, precedida de consentimento informado.
Colheita	Recolha de CECU para uma bolsa de colheita estéril.
Processamento	Redução do volume celular, seguido de centrifugação, com obtenção de um concentrado leucocitário.
Criopreservação	Adição de agente crioprotetor e armazenamento em cassete de congelamento.
	Congelamento a taxa controlada de 1-2°C/ min, até temperatura final de -156°C em azoto líquido ou vapor, ou congelamento a taxa não controlada em congelador a -80°C.
Descongelamento	Descongelamento da amostra em banho-maria, a 37°C.
Lavagem	Remoção do agente crioprotetor, por lavagem com albumina e dextrano 40 em solução salina isotónica.
Acondicionamento	Acondicionamento das CECU viáveis para transplantação a realizar o mais breve possível.

Figura 6 – Etapas do processo de criopreservação de células estaminais do cordão umbilical. (Adaptada de 106)

## **8. Bancos de criopreservação**

A criopreservação de CECU, sob padrões de alta qualidade, é assegurada por diversos bancos que se podem categorizar em dois tipos principais: públicos e privados. (93,109,110) Embora esta prática tenha sido iniciada em hospitais e instituições sem fins lucrativos, onde as amostras são processadas e transplantadas em doentes sem relação com o dador, hoje, para além dos bancos públicos, existem empresas privadas que preservam CECU para uso exclusivo do próprio dador ou familiares. (93,98,111)

Os bancos de criopreservação de CECU têm contribuído, fortemente, para a minimização do tempo requerido na procura de um dador não relacionado e compatível com o doente que se procura transplantar. De facto, estima-se que o tempo de espera seja reduzido de 3 a 4 meses para 12 dias, quando a doação de CE da MO ou sangue periférico é substituída por CECU. (109)

Estudos recentes revelaram que, aproximadamente, 800.000 amostras de sangue do CU estão criopreservadas em bancos públicos de 45 países, enquanto os bancos privados, de quase 100 países, armazenam mais de 4 milhões de amostras de sangue do CU. (109,112)

### **8.1. Bancos públicos**

Os bancos públicos possibilitam a criopreservação de CECU doadas, altruistamente, para uso alogénico, o que significa que se destinam a qualquer cidadão que delas necessite, mesmo sem relação com o dador. (92,111) Os procedimentos de colheita, transporte, processamento, análise e armazenamento de CECU são isentos de custos para os pais dadores, (92,97,113) sendo o seu financiamento assegurado, geralmente, por fundos públicos governamentais e/ou por doações monetárias nacionais. (97,111)

Os bancos públicos são, ainda, altamente regulamentados, segundo os padrões estabelecidos a nível nacional, podendo até ser credenciados para integrar redes internacionais. (114) Assim, as amostras doadas, por voluntários anónimos, são tipificadas para HLA e inseridas num registo nacional ou internacional, possibilitando, neste último caso, que sejam revistas por centros de transplante em todo o mundo, (15,97,110) o que significa que, em caso de necessidade futura, nunca se consegue garantir que os dadores de CECU ou os seus familiares terão acesso à amostra, especificamente, doada. (92,97)

A ausência de custos, aliada à disponibilidade das amostras para transplantação futura, perante um elevado número de doentes a nível mundial, constituem vantagens dos bancos públicos face aos bancos privados. Assim, os bancos públicos responsáveis pela criopreservação de CECU são considerados a opção ideal para atender às necessidades de indivíduos de minorias étnicas e de indivíduos com haplótipos HLA incomuns que permanecem sub-representados nos registos mundiais de dadores não relacionados. (97) Para além disso, os bancos públicos possibilitam, ainda, dar resposta a situações patológicas, de que são exemplo as leucemias ou os linfomas, em que, por anomalia genética, o transplante autólogo não é recomendado, já que tal anomalia poderá estar presente nas CECU do dador. (15,111)

Os bancos públicos são projetados para atender às necessidades de qualquer cidadão que deles necessite, pelo que não podem acomodar padrões de qualidade que não sejam considerados os mais elevados. Neste sentido, os bancos públicos definem critérios muito rigorosos, relativamente, a variáveis chave, como o volume de colheita, o número de CNT de cada amostra (mínimo de  $1 \times 10^9$  CNT), a técnica assética adotada ou até o anticoagulante usado. (97,110) Tal facto, permite criar um inventário com amostras de alta qualidade que serão associadas a um enxerto mais rápido e com taxas aceitáveis de complicações relacionadas ao transplante. (97) Consequentemente, um número significativo de amostras doadas a bancos públicos não reúne, muitas vezes, os requisitos necessários para utilização em transplantação, sendo essas amostras utilizadas em investigação científica ou controlo de qualidade. (97,103) A preservação de CECU em bancos públicos nacionais permite, ainda, armazenar amostras de características genéticas representativas da população que pretendem cobrir. (16)

## **8.2. Bancos privados**

Nos bancos privados é feita a criopreservação de CECU que se destinam, exclusivamente, ao transplante autólogo ou de um familiar do dador. (15,92,97) Assim, contrariamente aos bancos públicos, é sempre garantido ao dador a utilização das suas próprias CE, perante uma eventual necessidade de uso terapêutico. (111) Contudo, o armazenamento de CECU, nos bancos privados, é assegurado por verbas financeiras, disponibilizadas pelos dadores aos próprios bancos de criopreservação. O valor dessas verbas varia em função dos serviços prestados, já que todos os procedimentos são pagos – desde a colheita, passando pelo processamento propriamente dito das CECU e até a manutenção do armazenamento, durante o período de tempo pretendido pelo dador, é assegurada pelo pagamento de uma taxa anual. (97,110–112)

Embora as CECU criopreservadas em bancos privados se destinem, somente, à utilização pelo próprio dador ou familiares, os padrões de qualidade não devem, igualmente, ser descuidados ao longo de todos os procedimentos inerentes à criopreservação. Contudo, os critérios definidos para a aceitabilidade da amostra respeitam, geralmente, padrões menos exigentes do que os observados nos bancos públicos. Exemplo disso é o menor volume de amostra requerido ou o número mínimo de CNT presentes na amostra para a sua aceitabilidade, que desce de  $1 \times 10^9$  para  $1 \times 10^8$  nos bancos privados. (97,110,113) Sendo os critérios de aceitabilidade das amostras mais abrangentes nos bancos privados, é expectável que um menor número de amostras seja rejeitado e, consequentemente, os bancos privados armazenem uma maior percentagem de CECU em relação aos bancos públicos. (97)

Pelos custos acrescidos e a reduzida probabilidade de um indivíduo necessitar, futuramente, de um transplante autólogo (inferior a 1 em 20.000, nos primeiros 20 anos de vida), a criopreservação de CECU, em bancos privados, é considerada uma temática controversa, já que alguns autores defendem que a criopreservação dessas amostras, em bancos públicos, refletir-se-ia num quadro muito mais benéfico, pela disponibilidade e possibilidade de utilização por outros cidadãos. Por essa razão, diversos autores têm defendido que o recurso a bancos privados para criopreservação de CECU somente deverá ser feito na presença de patologias, como leucemia, hemoglobinopatia, linfoma ou síndrome

de falência da MO, em indivíduos irmãos do neonato. (15) Sabe-se que, pela herança do HLA, a probabilidade de qualquer irmão ser um par HLA completo para outro irmão é de 25%, aumentado essa probabilidade com o número de irmãos, o que justifica, por sua vez, para muitos autores, que somente nas situações patológicas referidas anteriormente se utilizem os bancos privados. (97)

Ainda assim, apesar da reduzida probabilidade de utilização de CECU em transplantes autólogos, estudos recentes têm referido que a categoria dominante do seu uso é a lesão cerebral. (112)

### 8.3. Bancos públicos vs bancos privados

Conforme já foi referido, os bancos públicos e privados, responsáveis pela criopreservação de CECU, apresentam particularidades que os diferenciam e permitem dar resposta a distintos casos. A Tabela 4 evidencia, resumidamente, as principais diferenças entre estes dois tipos de bancos. (16,93,114,115)

Tabela 4 – Bancos públicos vs bancos privados. (Adaptada de 16, 93,114,115)

	Banco público	Banco privado
Colheita	Maior limitação geográfica para a realização da colheita	Menor limitação geográfica para a realização da colheita
Direitos	CE deixam de ser propriedade do dador e passam a ser propriedade pública, acessível a um grande número de indivíduos	CE são propriedade do dador, estando reservadas para o seu uso exclusivo ou de familiares
Disponibilidade	Demorada (semanas ou meses)	Imediata
Custos inerentes ao processo de criopreservação e armazenamento	Isento de custos (financiamento público, sem fins lucrativos)	O dador paga uma taxa inicial para assegurar o processo de criopreservação e uma taxa anual para assegurar a manutenção da amostra criopreservada (financiamento privado, com fins lucrativos)
Custos inerentes à utilização	O doente que necessita do transplante paga uma taxa que possibilita ao banco público disponibilizar CECU	Isento de custos
Utilização pelo dador ou familiares	Não é garantido ao dador a recuperação das próprias CECU, sempre que as mesmas se revelem necessárias	É garantido ao dador a recuperação das próprias CECU, sempre que as mesmas se revelem necessárias
Tipos de transplante	Transplante alogénico	Transplante autólogo ou alogénico



<b>Complicações</b>	Maior probabilidade de incidência de DECH	Sem manifestação de DECH
<b>Ensaio clínico</b>	Menor disponibilidade para o uso em ensaios clínicos	Disponibilidade imediata para o uso em ensaios clínicos de diversas áreas patológicas
<b>Acesso à informação</b>	Unânime	Desigual e competitivo
<b>Qualidade do processo de criopreservação</b>	Universal, regulada por padrões nacionais e/ou internacionais de qualidade	Variável e por vezes desconhecida
<b>Princípios</b>	Altruísmo, gratuidade, confidencialidade, igualdade de acesso a todos os cidadãos, critérios máximos de qualidade	Individualismo, fins lucrativos, desigualdade de acesso a todos os cidadãos, critérios mínimos de qualidade

## 8.4. Contexto em Portugal

A realidade portuguesa tem espelhado, ao longo dos anos, um cenário desequilibrado e controverso, no que concerne aos bancos públicos e privados de criopreservação de CECU, uma vez que estes dois tipos de bancos assumem uma valoração ética muito diferente.

O Banco Público de Células do Cordão Umbilical (BPCCU), também conhecido por Lusocord, foi criado em 2009, pelo Estado Português, tendo-se assumido como o primeiro e único banco público de CECU, até à data. (116,117) Em 2012, alegadas não conformidades, no processamento das amostras, e irregularidades do foro financeiro contribuíram para que o BPCCU enfrentasse um período crítico, que chegou a ditar a suspensão dos seus serviços. (118) Por essa razão, o BPCCU foi alvo de um processo de reestruturação, a fim de evitar o término da sua atividade e, ainda durante o ano de 2012, passou a estar sob a responsabilidade do Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST). Um ano mais tarde, em 2013, o BPCCU retomou a prestação dos seus serviços, dedicando-se, até hoje, à receção, análise, processamento, criopreservação e distribuição de dádivas benévolas e altruístas de sangue do CU, que cumpram em matéria de princípios, organização e rigor técnico, todas as exigências transportas para a legislação nacional, a partir das diretivas europeias associadas a esta atividade. (116,119)

Atualmente, a colheita de CECU para o BPCCU é realizada em quatro unidades nacionais (Centro Hospitalar de São João, Hospital Pedro Hispano - Unidade Local de Saúde de Matosinhos, Maternidade Júlio Dinis - Centro Hospitalar do Porto e Hospital Prof. Doutor Fernando da Fonseca), (120) que asseguram um sistema de gestão de qualidade criterioso, exigente e profissional, assente nas boas práticas e que privilegia, sempre, a segurança de todos os cidadãos que necessitem deste serviço. (121)

Desde que reiniciou a sua atividade, o objetivo do BPCCU de conseguir a certificação internacional ainda não foi alcançado. Segundo os últimos dados disponibilizados, no final de 2016, o BPCCU apresentava 466 amostras criopreservadas, não tendo ainda alcançado o número mínimo exigido (500) para o pedido de certificação internacional e a consequente integração na rede de bancos de criopreservação a nível mundial. (119) A inter-relação de

todos os bancos públicos que integram esta rede internacional é assegurada por uma organização sem fins lucrativos, com sede em Paris, denominada EuroCord. A sua principal missão é promover desenvolvimentos no uso clínico de CECU para transplante e terapia inovadora, em patologia maligna e não maligna, através da colheita, análise e validação de dados de indivíduos transplantados e registados, em bancos públicos, que colaboram com a EuroCord e integram esta rede internacional. (122,123)

No que concerne a entidades privadas, Portugal apresenta cinco bancos de criopreservação de CECU (Bebevida, Criovida, Bioteca, Cytothera e Crioestaminal), aos quais se juntam mais três empresas comerciais (BebéCord, Criobaby e FutureHealthBiobank) que recorrem a laboratórios de outras empresas ou localizados no estrangeiro para o processamento das amostras. A estes oito bancos privados soma-se ainda o Instituto Valenciano de Infertilidade que, apesar de dispor de um laboratório em Lisboa, está vocacionado para a recolha de amostras no mercado espanhol, onde não é prevista a exclusividade do seu uso privado, podendo as amostras ser disponibilizadas para uso público. (124)

De todos os bancos privados de criopreservação de CECU que operam em Portugal, a Crioestaminal foi pioneira, tendo iniciado a sua atividade em 2003 e tendo recolhido e criopreservado, desde a sua fundação até hoje, mais de 100.000 amostras. (125,126)

Até 2009, a ausência de legislação nacional, que sustentasse e harmonizasse as práticas dos bancos portugueses, ditou que, nem sempre, se assistisse ao cumprimento dos requisitos definidos pela autoridade competente para os serviços de transplantação e que vigorava à data, denominada Autoridade para os Serviços de Sangue e Transplantação (ASST). Contudo, a transposição de três diretivas europeias para a legislação nacional portuguesa, sob a forma do Decreto-Lei nº12, de 26 de Março de 2009, ditou uma inversão na realidade a que se assistia até então. A imposição de um “regime jurídico de qualidade e segurança relativa à dádiva, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento, distribuição e aplicação de tecidos e células de origem humana” impôs que, a partir de 2009, todos os bancos portugueses para poderem operar tinham de preencher os requisitos impostos pela lei, sendo este setor regulado e autorizado, até 2011, pela ASST. (121,127) O surgimento, nesse mesmo ano, do Decreto-Lei nº124, de 29 de Dezembro de 2011, decretou a extinção da ASST, bem como a reestruturação do Instituto Português de Sangue, IP, passando este a designar-se por Instituto Português de Sangue e da Transplantação, IP e a integrar as atribuições da ASST. Todavia, nem todas as atribuições foram integradas no novo instituto, já que as respeitantes à “autorização de unidades, serviços e processos em relação à dádiva, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento e distribuição de sangue humano, de componentes sanguíneos, de órgãos, tecidos e células de origem humana” e a regulamentação e o controlo do cumprimento dos padrões de qualidade e segurança das atividades anteriormente enunciadas, ficaram a cargo da Direção Geral de Saúde (DGS). (128) A DGS é, então, atualmente, a autoridade competente para células, tecidos, sangue e órgãos, sendo as funções acima citadas exercidas, especificamente, pelo Departamento da Qualidade na Saúde. (129) Todas as outras atribuições da extinta ASST são, hoje, missão do IPST, IP, incluindo o Banco Público de Sangue do Cordão Umbilical (Lusocord) e o Banco de Tecidos. (130)

## **8.5. Contexto na Europa e no Mundo**

Ainda que a criopreservação de CECU seja uma temática transversal a todo o mundo, o modo como a mesma é abordada nem sempre é sobreponível de país para país.

Se nos focarmos à escala mundial, o surgimento do primeiro banco público credenciado ocorreu mais precocemente do que em Portugal, tendo sido fundado em 1991, no New York Blood Center, nos Estados Unidos. (16) A realidade dos bancos públicos expandiu-se depois a outras cidades mundiais, como Paris e Milão, acompanhada, igualmente, pela expansão dos bancos privados que, na maioria dos países ocidentais, antecedeu até a dos bancos públicos. Embora na maioria dos países do Ocidente, de que são exemplo Portugal e Espanha, coexista hoje, frequentemente, um sistema misto, caracterizado pelos dois tipos de bancos de criopreservação de CECU, existem países onde se assiste a uma condição diferente. França, Itália, Chipre ou Irlanda são exemplos de países onde os bancos privados são proibidos, uma vez que os respetivos comités de bioética consideram o armazenamento privado de CECU, para uso autólogo, inútil e prejudicial ao sistema público de doações. O próprio Conselho da Europa recomendou, em 2004, que “se forem estabelecidos bancos de sangue do cordão, estes devem ser baseados na doação altruísta e voluntária do sangue do cordão e usados para transplantes alogénicos e investigação relacionada”. Existem ainda países, como Espanha, que, apesar de permitirem a existência de bancos privados, impõem que as amostras fiquem disponíveis para uso público, sempre que necessário. (16,114)

Para além dos dois modelos de bancos evidenciados anteriormente – banco público e banco privado, e que operam em território português, existem ainda outros modelos de bancos de criopreservação de CECU, que são adotados a nível mundial por outros países.

Um desses modelos é o banco familiar, no qual é feita a criopreservação e armazenamento de CECU direcionadas a famílias com grau de parentesco ao dador, para as quais pode ser clinicamente vantajoso um transplante de células compatíveis. Este modelo acaba por se apresentar como um prolongamento dos bancos privados e são poucos os países que permitem a sua adoção. Os países estabelecem, então, listas oficiais de indicações, para as quais o transplante de CEH provou ser efetivo e para o qual a colheita dirigida revelou ser apropriada. A utilização de CECU para familiares relacionados com o dador tem-se revelado vantajosa, comparativamente ao transplante alogénico, já que o indivíduo transplantado apresenta uma menor probabilidade de desenvolver DECH, uma maior probabilidade de sobrevivência e a oportunidade de recolher, em caso de rejeição ou recaída, CE da MO do mesmo dador. (114)

Um outro modelo baseia-se no conceito de banco híbrido, uma vez que reúne os princípios de um banco público e de um banco privado, isto é, uma porção da amostra é armazenada para uso privado (do próprio dador ou familiares) e a outra porção fica acessível ao uso público. O Virgin Bank, no Reino Unido, ou o StemCyte, nos Estados Unidos, Taiwan e Índia, são exemplos de bancos híbridos de criopreservação de CECU. O modelo de banco híbrido alberga, ainda, a existência de um modelo variante a este conceito, no qual é permitida a doação da totalidade da amostra de CECU a bancos públicos, continuando os dadores a manter o direito de propriedade da amostra, durante um determinado período de tempo, que cubra eventuais necessidades da criança. Embora seja um modelo possível, é também um modelo pouco usado a nível mundial, pelas preocupações e controvérsias éticas, científicas, económicas e sociais a ele associadas. (93,114)

## **9. Questões éticas**

Os bancos de criopreservação de CECU, para além da obediência a requisitos de qualidade técnico-científica, devem cumprir requisitos éticos fundamentais que legitimem a sua prática, o que significa que devem, sempre, garantir o respeito pela dignidade dos indivíduos e a justiça social da comunidade envolvida. (16)

As questões éticas que se têm levantado em torno da investigação clínica das CE não são transversais em todo o mundo. Partindo do princípio que diferentes Estados, administrações ou órgãos adotam leis e pareceres distintos entre si, as posições éticas que assumem são também, necessariamente, diferentes entre si. (17) No entanto, é notório que as diferentes posições éticas assumidas, em torno da temática das CE, partilham controvérsia e interpretações antagónicas consideráveis que não são, linearmente, transpostas para as matérias relacionadas com as CE obtidas, especificamente, do CU. (17,131)

No âmbito das CECU as contrariedades éticas prendem-se, sobretudo, com a qualidade da informação prestada e todas as questões morais e deontológicas a ela inerentes, nomeadamente, consentimento informado e propriedade, e com a acessibilidade aos bancos de criopreservação. (16,132)

A informação objetiva e, tanto quanto possível, neutra, de todos os dados relevantes sobre o processo de criopreservação de CECU (colheita, armazenamento e possíveis utilizações terapêuticas) é um direito que assiste todos os cidadãos e que impulsiona uma tomada de decisão consciente. (16,93,132) A qualidade da informação prestada é indispensável, não só num plano individual, para a obtenção de consentimento, mas também num plano social, para a publicitação de uma atividade socioprofissional, em que o cidadão se pode vir a tornar parte interessada. Sabe-se que o consentimento informado tem vindo a perder a sua verdadeira essência, já que, cada vez menos, é visto como um requisito ético para proteção do sujeito que o concede, convertendo-se, antes, numa obrigatoriedade jurídica para defesa da entidade que o solicita. Assim, perverte-se, cada vez mais, um processo ético num ato jurídico. (16) No entanto, é unânime que o consentimento informado assente, sempre, na transparência da informação e na ausência de aceitação de incentivos financeiros, ou outros, que motivem o fornecimento de amostras aos bancos de criopreservação. (132)

A discussão ética, em torno de quem deve assumir a responsabilidade na decisão de doação de CECU, é outra das questões, inevitavelmente, impostas, quando se fala de consentimento informado. (17) Há quem defenda que as CECU são propriedade da criança, mas há também quem defenda que são propriedade dos pais. Embora vários pareceres sejam proferidos neste âmbito, não existe unanimidade entre os meios filosófico, jurista, ético e científico sobre o estatuto do feto. Em todas as leis nacionais, uma vez fora do corpo da mãe, a criança é reconhecida como pessoa jurídica. No entanto, a ausência de capacidade de entendimento e de fornecimento de consentimento informado, levantam uma questão problemática e controversa, na qual a legislação ditou a ausência de autonomia na tomada de decisão, por parte da criança, e impôs uma das duas hipóteses: ambos os pais consentem a doação de CECU ou a decisão fica apenas a cargo da mãe. (17,132)

Aliado ao consentimento informado surge, ainda, a questão da proteção de dados dos dadores de CECU. (132) O manuseamento de material biológico humano pode assumir

diferentes graus de sensibilidade e envolver questões de privacidade e de não discriminação, pelo que a divulgação de dados deve ser sempre sensível à natureza da informação e assentar, deste modo, numa política de proteção de dados. (16) Também em áreas como a investigação científica, a utilização de CE deve pressupor a não divulgação de dados pessoais, que será assegurada pela supervisão de uma comissão de ética. (18,19) Em Portugal, é o Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida, estabelecido pela Lei nº14/90, de 9 de Junho, da Assembleia da República, (133) que assume o papel de conciliar a investigação e a progressão científica com o respeito pela vida humana, (18,19) já que a sua missão é “acompanhar sistematicamente a evolução dos problemas éticos suscitados pelos progressos científicos nos domínios da biologia, da medicina ou da saúde em geral e das ciências da vida”. (133)

Para além do consentimento informado, e conforme já foi referido, a acessibilidade aos bancos de criopreservação constitui a outra grande questão ética associada a esta temática. O acesso a bancos de criopreservação fundamenta-se, idealmente, na equidade, que deverá sustentar, sempre, uma sociedade democrática justa. No entanto, bancos públicos e privados invocam princípios éticos distintos, onde apenas o respeito pela confidencialidade é comum a ambos os bancos, sendo que, a perceção da obrigação deste princípio não é, ainda assim, absolutamente coincidente nos dois tipos de bancos. Nos bancos privados, a confidencialidade é vista como uma imposição legal e, não, como uma resposta ética dos profissionais à privacidade dos indivíduos. De igual modo, a qualidade, legalmente exigida no processo de criopreservação de CECU, não cumpre os mesmos padrões, nem assenta no mesmo nível de exigência, em bancos públicos e privados. (16) O princípio ético do altruísmo, praticado em bancos públicos, dá lugar ao da beneficência individual nos bancos privados, uma vez que se trata de um serviço que é, eventualmente, disponibilizado ao próprio ou aos seus familiares, restringindo o acesso a qualquer outro cidadão. A rejeição dos princípios do altruísmo e da gratuidade, na prática dos bancos privados, motiva que seja questionado o cumprimento de um outro princípio ético fundamental em qualquer sociedade: a justiça. Os bancos privados criam uma barreira no acesso aos serviços que prestam, reservando esses serviços a uma elite socioeconómica capaz de os pagar. (16,112) Pelo contrário, a existência de bancos públicos garante a acessibilidade universal a CECU, onde o princípio da justiça reina pela disponibilidade de um serviço análogo a toda a população. Por esta razão, é defendido, por muitos, a prática exclusiva de bancos públicos, capazes de dar resposta a um modelo igualitário da justiça, em que esta é exercida e cumprida, através de uma igual distribuição dos bens. Ainda que o respeito integral pelos direitos individuais seja assegurado nos bancos privados, e não, nos bancos públicos, o princípio ético da justiça é questionável e ambíguo, já que o respeito pelo acesso às próprias CECU se traduz na aquisição de serviços por uns, quando esses mesmos serviços permanecem inacessíveis a outros. (16)

## **10. Importância terapêutica das células estaminais do cordão umbilical**

Desde 1988 que as CEH constituem o tipo de CECU mais utilizado na prática clínica. (27) A primeira utilização deste tipo de células ocorreu, há 31 anos, em Paris, na transplantação de uma criança de 3 anos, portadora de anemia de Fanconi. O sucesso do procedimento constituiu um marco no mundo médico e contribuiu para o crescente interesse em torno desta fonte de CE. (12,20)

Após anos de pesquisa e experiência terapêutica, as CECU representam, atualmente, um recurso valioso e consolidado, disponível para o tratamento bem-sucedido de mais de 80 patologias, nomeadamente, do foro oncológico, hematológico, metabólico, imunitário e medular. (20–22) O potencial papel das CECU, no que concerne à Medicina Regenerativa, assume hoje, igualmente, um lugar de destaque em patologias, cujo tratamento eficaz ainda não é conhecido, entre elas, doenças cardiovasculares, doenças do sistema nervoso central (SNC), diabetes, entre outras. (12,20)

### **10.1. Aplicabilidade terapêutica atual das células estaminais do cordão umbilical**

Hoje, o tratamento com CECU é eficaz e está totalmente comprovado, padronizado e generalizado em múltiplas situações clínicas, (22) que se encontram listadas na tabela 5.

A utilização autóloga de CECU é, geralmente, praticada na presença de patologias que não estão presentes à nascença, sendo adquiridas ao longo da vida, como é o caso de deficiências medulares e tumores sólidos. Pelo contrário, perante patologias presentes à nascença, geralmente associadas a deficiências genéticas, como é o caso das hemoglobinopatias e doenças metabólicas, o transplante alogénico de CECU de dadores familiares ou não relacionados é o preferível. (21)

Tabela 5 – Aplicabilidade terapêutica atual das células estaminais do cordão umbilical. (Adaptada de 21)

Doenças Oncológicas	Hemoglobinopatias	Doenças Metabólicas	Imunodeficiências	Deficiências Medulares
Leucemia linfoblástica aguda	$\beta$ -talassemia <i>major</i>	Adrenoleucodistrofia	Síndrome de Omenn	Anemia aplástica
Leucemia mieloblástica aguda	$\beta$ -talassemia intermédia	Doença de Gunther	Imunodeficiência combinada severa com deficiência de adenosina Deaminase (ADA-SCID)	Anemia aplástica adquirida
Leucemia mieloide crónica	$\alpha$ -talassemia <i>major</i>	Doença de Gaucher	Hipogamaglobulinemia	Anemia de Fanconi
Leucemia linfocítica crónica	$\alpha$ -talassemia intermédia	Síndrome de Hunter	Síndrome de DiGeorge	Anemia diseritropoiética congénita
Leucemia mielomonocítica	Anemia falciforme	Síndrome de Hurler	SCID ligada ao cromossoma x	Anemia de Blackfan-Diamond
Tumores sólidos (ex: neuroblastoma)		Síndrome de Hurler-Scheie	Síndrome de Wiskott Aldrich	Anemia sideroblástica congénita
Linfoma de Hodgkin		Síndrome de Maroteaux-Lamy	Síndrome de ataxia-telangiectasia	Anemia hipolinfoproliferativa
Linfomas de não-Hodgkin		Síndrome de Sanfilippo	Agamaglobulinemia ligada ao cromossoma x	Aplasia eritroide pura
Anemia refratária		Síndrome de Hermansky-Pudlak	Doença granulomatosa crónica	Neutropenia cíclica
Mielofibrose		Mucopolidose tipo II e tipo III	Deficiência IKK gama	Neutropenia autoimune
Mastocitose sistémica		$\alpha$ -manosidose	Síndrome linfoproliferativo ligado ao cromossoma x	Síndrome de Evans
Síndrome linfoproliferativa autoimune		Doença de Niemann Pick	Síndrome de Griscelli	Trombocitopenia neonatal severa
Histiocitose familiar		Doença de Sandhoff	Síndrome de Nezelof	Dermatomiosite juvenil
Histiocitose das células de Langerhans		Doença de Tay Sachs		Xantogranuloma juvenil

Linfohistiocitose hemofagocítica		Doença de Krabbe		Pancitopenia
Granulomatose linfomatosa		Leucodistrofia maticromática		Síndrome de Shwachman-Diamond
Síndrome infantil da monossomia do cromossoma 7		Fucosidose		Síndrome de Kostmanns
		Gangliosidose GM1		Síndrome de Pearson
		Doença de Wolman		Hemoglobinúria paroxística noturna
		Aspartilglicosaminúria		Doença de Glanzmann
		Síndrome de Morquio		Trombocitopenia amegacariocítica
<b>Outras doenças</b>		Síndrome de Lesch-Nyhan		
Osteopetrose		Doença de Austin		



## **10.2. Aplicabilidade terapêutica potencial das células estaminais do cordão umbilical**

Apesar das CECU serem hoje reconhecidas como uma possível terapêutica de múltiplas patologias, a aplicabilidade terapêutica destas células ainda está longe de ser conhecida na sua totalidade. Em mais de 600 laboratórios de criopreservação de CE em todo o mundo, investigadores e cientistas desenvolvem, atualmente, mais de 300 ensaios clínicos, na tentativa de comprovar a eficácia e/ou a segurança de novas terapêuticas em humanos e alcançar, assim, avanços nesta área. (22)

O uso já reconhecido das CEH do sangue do CU em patologias do foro sanguíneo, poderá ser complementado com a utilização de CEM do tecido do CU. Estudos experimentais, ensaios pré-clínicos e ensaios clínicos têm vindo a demonstrar o potencial terapêutico destas células em diversas áreas, nomeadamente, na reconstrução de tecidos lesionados, como músculos e cartilagem, e na substituição de células, em casos de Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla e doenças cardiovasculares. O espectro de aplicações futuras das CEM do tecido do CU está, também, alargado à capacidade de originarem células que o organismo deixa de produzir, como se verifica na Diabetes *mellitus* tipo 1. A utilização das CEM pode ser feita isoladamente, ou como terapêutica coadjuvante nos transplantes hematopoiéticos, a fim de aumentar a probabilidade de sucesso dos mesmos. (22) Paralelamente às CEM, as CPEs, isoladas a partir do revestimento do CU, estão atualmente sob investigação, a fim de explorar o potencial destas células num amplo campo de aplicações, desde a cicatrização de feridas, regeneração da superfície ocular, tratamento da Diabetes *mellitus* tipo 1, insuficiência hepática, entre outras condições. (134,135)

Assim, os ensaios clínicos têm revelado que a terapia com CECU constitui um campo promissor e de rápido desenvolvimento da Medicina Regenerativa, já que se trata de uma área da ciência que aplica princípios da biologia celular e da engenharia para reparar e/ou substituir tecidos ou órgãos que perderam as suas funções por diversas razões (envelhecimento, doença, lesão ou defeito congénito). (12,134,136) Neste âmbito, as CECU assumem uma utilidade acrescida em patologias que, atualmente, ainda não dispõem de um tratamento eficaz, de que são exemplo as doenças neurodegenerativas, autoimunes, inflamatórias intestinais, cardiovasculares, ou até situações de cicatrização de feridas e produção de componentes sanguíneos, como ilustrado na Figura 7. (12,22,137)

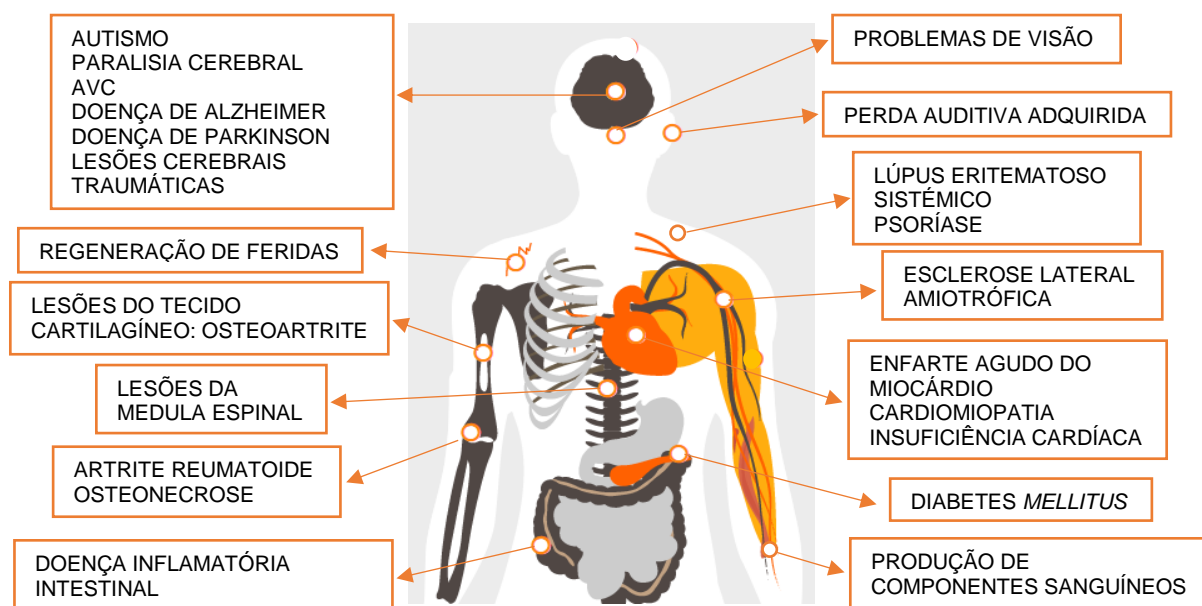


Figura 7 – Principais aplicações terapêuticas potenciais das células estaminais do cordão umbilical. (Adaptada de 137)

### 10.2.1. Doenças neurológicas

A reduzida capacidade regenerativa do SNC dita que qualquer dano nele observado seja, praticamente, irreversível, podendo apresentar extensas repercussões nas capacidades sensoriais, motoras e cognitivas. (12,138) Uma vez que o SNC é, fortemente, influenciado pelo envelhecimento e suscetível a doenças e/ou lesões, de que são exemplo a encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI), o traumatismo crânio-encefálico, o acidente vascular cerebral (AVC), a lesão da medula espinal, a esclerose lateral amiotrófica (ELA), as doenças de Parkinson (DP) e Alzheimer (DA), a perda auditiva adquirida, a paralisia cerebral (PC) e o autismo, a regeneração neural assumiria uma importância acrescida. (12,137,139) Neste sentido, as CECU ocupam um lugar de destaque, já que diversos estudos têm demonstrado a sua capacidade de diferenciação em neurónios, astrócitos e oligodendrócitos funcionais, contribuindo, assim, para a regeneração neural, (12) do mesmo modo que a manipulação genética ou farmacológica de CE adultas e alteradas do hipocampo contribui. (139)

#### **Encefalopatia hipóxico-isquêmica**

A diminuição do aporte de oxigénio e a consequente hipoperfusão tecidual significativa constituem a base da síndrome designada EHI. Esta síndrome, decorrente de lesões cerebrais ocorridas no útero ou no início da infância, pode apresentar diversas etiologias: genética, metabólica e infecciosa, estando associada a múltiplos sintomas neurológicos. (140–142) Kidani *et al.* conduziram um estudo, *in vivo*, a fim de aferir o efeito das CPEs (CD 133+), provenientes do sangue do CU, na EHI, uma vez que já era conhecida a capacidade de regeneração neural destas células em ensaios *ex vivo*. Para tal, foi induzida a lesão cerebral em ratos e administrada, 24h após a lesão, por via intraperitoneal, uma injeção de células CD133+. Os resultados obtidos, por análise imunohistoquímica, revelaram não só a presença

de CPEs, provenientes do sangue do CU, no tecido cerebral, como também uma melhoria da função motora dos animais e uma proteção cerebral de quadros hipóxico-isquêmicos. (141)

### **Traumatismo crânio-encefálico e AVC**

O traumatismo crânio-encefálico e o AVC são doenças neurológicas que partilham, a nível fisiopatológico, semelhanças na lesão secundária do tecido cerebral. As terapias celulares disponíveis centram-se, essencialmente, na utilização de CEH e CEM, uma vez que estas demonstram efeitos regenerativos do tecido cerebral lesionado, assim como um potencial angiogénico. O estudo desenvolvido por Chen *et al.* é exemplo disso mesmo, já que, ao avaliar-se o efeito das CEM do CU, no tecido cerebral isquémico, se observaram melhorias significativas das funções neurais dos modelos animais usados. A benéfica capacidade angiogénica das CECU, neste tipo de lesões neurológicas, é então decorrente, segundo um outro estudo desenvolvido por Hsieh *et al.*, de diversos mecanismos que estas células apresentam, nomeadamente, aumento dos níveis de expressão de neurotransmissores locais, promoção do crescimento axonal, aumento da neuroplasticidade e potenciação da síntese de fatores de transcrição. (140)

### **Lesão da medula espinal**

As lesões da medula espinal são causadas, maioritariamente, por traumatismos, embora outras etiologias possam estar na base da degeneração ou compressão da medula espinal. (143) Esta condição patológica apresenta forte impacto socioeconómico e psicológico, aliado a uma perda considerável da qualidade de vida dos doentes, (143,144) podendo motivar situações como a perda de sensibilidade, a paralisia e a disfunção sexual. (145) Neste âmbito, a utilização de CEM e CEH do CU tem-se revelado benéfica, quer em ensaios clínicos, quer em ensaios pré-clínicos, pelo grande potencial de regeneração destas células. O transplante de CEM do CU revelou promover a recuperação das funções sensorial e motora, por meio da diferenciação da linhagem neural, bem como a recuperação da secreção de hormonas parácrinas e da regulação dos processos inflamatórios. (145)

### **Esclerose lateral amiotrófica**

A ELA é uma doença neurodegenerativa, caracterizada pela degeneração progressiva dos neurónios motores, responsáveis pela transmissão dos sinais necessários à contração muscular. De etiologia ainda desconhecida, a ELA leva a uma perda progressiva da força muscular, chegando a comprometer a manutenção das funções vitais dos doentes. As limitadas opções terapêuticas, atualmente disponíveis para esta doença, têm ditado a urgência de encontrar novas abordagens. Segundo estudos pré-clínicos e ensaios clínicos em curso, o sangue e o tecido do CU são considerados candidatos para o desenvolvimento de novas terapias para a ELA, uma vez que estas células têm revelado a capacidade de modular o microambiente onde os neurónios estão inseridos, promovendo assim a sua sobrevivência. (146)

Estudos desenvolvidos em modelos animais mostraram que a infusão de CE do sangue do CU humano originou resultados positivos, provocando um atraso na progressão da ELA e

um aumento significativo do tempo de vida dos ratinhos tratados, face ao grupo controlo. Os resultados obtidos têm, também, permitido inferir que a eficácia do tratamento é influenciada por uma intervenção precoce e pela dose celular administrada. (147) Ainda que vários ensaios clínicos em humanos, utilizando sangue e tecido do CU, estejam atualmente a decorrer, resultados preliminares sugerem que este tipo de terapia é segura em doentes com ELA. Todavia, a realização de mais ensaios clínicos é, ainda, requerida, de modo a perceber qual o efetivo grau de eficácia desta terapia na espécie humana. (146)

O diagnóstico de ELA a um doente, 6 meses antes do nascimento da neta, impulsionou a criopreservação das CE do sangue do CU da neta, sendo as mesmas posteriormente administradas ao doente, repartidas entre seis administrações. Embora se tenha verificado uma estabilização do *score* ALSFRS-R (Escala de Avaliação Funcional da Esclerose Lateral Amiotrófica – Corrigida), durante cerca de 24 meses, após a administração das CECU, posteriormente a esse período de tempo, a doença reiniciou a sua progressão, (148,149) o que justifica ainda a necessidade de desenvolvimento de mais ensaios clínicos em humanos. (146)

### **Doença de Alzheimer**

Por impedir a acumulação de substância  $\beta$ -amiloide, o processo de autofagocitose assume um importante efeito neuroprotetor na DA. A substância  $\beta$ -amiloide, sendo tóxica para os neurónios, desencadeia uma série de eventos que culminam na disfunção e subsequente morte neuronal. Neste sentido, estudos têm evidenciado o papel acrescido das CEM na depuração da substância  $\beta$ -amiloide, já que estas células fomentam a autofagocitose e, assim, exercem um efeito neuroprotetor em doenças neurodegenerativas. (150)

Os efeitos da transplantação de CEM do CU na DA, foram estudados em modelos animais (ratos) que expressavam configurações patológicas da proteína precursora amiloide semelhantes às que se verificam na DA. A observação de uma melhoria significativa da função cognitiva dos ratos, sem alteração dos níveis de proteína  $\beta$ -amiloide no hipocampo, reforçou a capacidade das CEM do CU diminuírem o *stress* oxidativo e promoverem a neurogénese do hipocampo. (151)

Paralelamente às CEM, as CEH do CU também manifestam efeitos favoráveis na DA. Um estudo conduzido em ratos verificou que a administração periférica, a curto e a longo prazo, de monócitos derivados de CEH do CU reduziu a concentração de substância  $\beta$ -amiloide no tecido cerebral, melhorando as funções motoras, de aprendizagem e de memória. (152) A viabilidade destes resultados é sustentada por um outro estudo, onde as CECU humano, administradas em ratos, por via intravenosa, mostraram uma biodistribuição e retenção relativamente altas, tanto a nível cerebral, como em vários órgãos periféricos. (153)

### **Doença de Parkinson**

Weiss *et al.* desenvolveram um estudo, no qual administraram CECU em ratos, cuja função dos neurónios dopaminérgicos foi propositadamente reduzida. Comparativamente ao grupo controlo, os ratos que receberam CECU sofreram uma reversão parcial dos sintomas associados à DP, o que justifica o potencial benefício desta abordagem clínica na doença. (140)

### **Paralisia cerebral**

A PC é uma patologia decorrente de lesões neurológicas que, geralmente, surge durante a gestação ou no momento do nascimento, podendo associar-se a uma sintomatologia diversificada, que engloba desde limitações físicas praticamente imperceptíveis, até alterações profundas a nível cognitivo. (154) Nos últimos anos, diversos estudos têm sugerido as CECU como potenciais armas terapêuticas na atenuação dos sintomas da PC, já que não é conhecida uma solução eficaz para o seu tratamento. (154,155) Para além do sangue do CU, cujos resultados em ensaios clínicos são promissores, o tecido do CU tem sido estudado como uma potencial alternativa terapêutica desta patologia, já que contém uma grande quantidade de CEM, capazes de produzir moléculas com efeitos benéficos em diversos processos. (154) Exemplo disso foi um estudo conduzido por Morioka C. *et al.*, que avaliou o efeito terapêutico decorrente da administração de CEM do CU na lesão neurológica associada à paralisia cerebral, através da comparação de 2 grupos de animais: um que recebeu placebo e outro que recebeu CEM. Os resultados do estudo revelaram uma melhoria significativa da lesão neurológica nos animais que receberam CEM do CU, o que sugere que a ação protetora destas células seja, provavelmente, decorrente dos seus efeitos anti-inflamatório e antioxidante, bem como da capacidade indutora de formação de novos vasos sanguíneos; mecanismos que, por sua vez, promovem a sobrevivência neuronal. (156)

### **Autismo**

Enquanto doença invasiva do desenvolvimento neurológico, o autismo induz uma desregulação imunitária e neuronal, estando a sua etiologia ainda por definir e a sua terapia limitada, sobretudo, a medidas comportamentais. (157) Assim, as CECU surgem como uma potencial alternativa terapêutica, sendo a terapia combinada de CEM e CEH do CU mais vantajosa no tratamento desta patologia. O uso concomitante dos dois tipos de células alia a regulação imunitária, oferecida pelas CEM, com a perfusão cerebral, proporcionada pelas células CD34+ do sangue do CU, o que gera uma melhoria dos sintomas comportamentais e funcionais. (157,158)

## **10.2.2. Doenças cardiovasculares**

Perante quadros de isquemia do miocárdio, é essencial recuperar a função cardíaca, através da promoção da neovascularização e da reparação do tecido lesado, sendo, no entanto, a capacidade de regeneração do miocárdio reduzida. (12,159) Por este motivo, as CE do sangue do CU constituem uma alternativa em eventos cardiovasculares, de que são exemplo o enfarte agudo do miocárdio (EAM), a insuficiência cardíaca e as cardiomiopatias, já que estas células migram, seletivamente, para o tecido lesado, verificando-se um aumento da densidade de capilares no local, assim como uma reparação e desenvolvimento da função cardíaca. (12)

Embora os mecanismos que justificam a regeneração cardíaca não estejam totalmente esclarecidos, várias hipóteses têm sido consideradas. Uma dessas hipóteses assenta na capacidade de diferenciação das CE do sangue do CU em cardiomiócitos. No entanto, acredita-se que essa diferenciação não é, por si só, capaz de sustentar a recuperação da

função cardíaca, sendo esta justificada por outros mecanismos, como a produção de fatores de crescimento angiogênicos, devido à hipoxia tecidual. Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* têm evidenciado a formação de novos vasos sanguíneos, bem como a migração de CE endógenas cardíacas, acreditando-se, até, que a neovascularização constitui o mecanismo fundamental de recuperação da função cardíaca. (12) O estudo desenvolvido por Zhang J. *et al.* exemplifica, exatamente, a possibilidade da neovascularização representar o mecanismo base de recuperação cardíaca, já que, após o transplante de CEM, não se observou uma diferenciação significativa destas células em cardiomiócitos, mas sim um contributo das mesmas para a formação de novos vasos sanguíneos no coração lesado, através da produção e secreção de *placental growth factor* (PLGF), mas não de *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A). (159) A capacidade de modelação da resposta inflamatória constitui, igualmente, uma outra competência das CE do sangue do CU, que poderá, também, contribuir para a recuperação da função cardíaca. As CE do sangue do CU controlam a expressão de moléculas pertencentes à cadeia da resposta inflamatória, influenciando, inevitavelmente, mecanismos endógenos, como é o caso do ajuste de respostas imunitárias e da inibição da fibrose. (12,160)

### **Enfarte agudo do miocárdio**

Enquanto evento cardiovascular, o EAM proporciona um ambiente pobre em oxigénio e nutrientes, constituindo uma limitação ao uso de terapia celular, como é o caso das CECU. Para dar resposta a esta limitação, foi desenvolvido um estudo, no qual se induziu a expressão de *vascular endothelial growth factor* (VEGF) em CECU, já que este promove a angiogénese e previne a apoptose das células endoteliais. As CECU modificadas foram, depois, transplantadas em modelos animais, submetidos a um EAM, tendo-se assistido ao aumento significativo da angiogénese na área afetada e da espessura do miocárdio, bem como à diminuição da fibrose, o que sugere a efetividade das CECU, com secreção de VEGF, na melhoria da função cardíaca geral. (161)

Um outro estudo, desenvolvido em porquinhos que foram intencionalmente submetidos a um EAM, reforça a efetividade das CECU nesta patologia. Neste caso, CEM do tecido do CU, quando transplantadas nos porquinhos, diferenciaram-se em cardiomiócitos e em endotélio vascular, melhorando, consideravelmente, a perfusão cardíaca e a função do tecido lesado. (162)

### **Cardiomiopatia e Insuficiência cardíaca**

Estudos realizadas na área têm indicado que a microvasculatura endocárdica e cardíaca modula a resposta contrátil do miocárdio, contribuindo, favoravelmente, para o tratamento de disfunções contráteis cardíacas, observadas em algumas cardiomiopatias. Deste modo, estando a proteção da vasculatura na base da preservação da função cardíaca, as CEM do sangue do CU podem assumir os seus potenciais efeitos, através da neovascularização e da secreção de grandes quantidades de fatores angiogênicos, antiapoptóticos e anti-inflamatórios. (163) A capacidade das CECU induzirem um acréscimo da fração de ejeção ventricular esquerda reforça a vantagem de utilização destas células em situações de cardiomiopatia dilatada, resultando numa diminuição da insuficiência cardíaca. (164)

### 10.2.3. Doenças autoimunes

Diabetes *mellitus* tipo 1, doença de Crohn (DC), artrite reumatoide (AR) e lúpus eritematoso sistêmico (LES) são exemplos de patologias autoimunes, onde as CECU têm assumido resultados funcionais bem-sucedidos, *in vivo*, em modelos animais, pelo que o seu potencial terapêutico se tem revelado promissor. (22,135,165)

#### Diabetes mellitus tipo 1

A Diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença autoimune, causada pela destruição das células  $\beta$  pancreáticas, produtoras de insulina, sendo a sua destruição mediada por células T reguladoras. Esta doença afeta, sobretudo, crianças e adolescentes, ficando os mesmos, permanentemente, dependentes da administração de insulina exógena, já que há um défice permanente de insulina endógena e, conseqüentemente, uma desregulação dos níveis de glucose no sangue. No entanto, a administração de insulina somente melhora a sintomatologia, não possibilita a cura da doença, uma vez que esta implica uma promoção da sobrevivência e ativação das células  $\beta$  produtoras de insulina e, simultaneamente, uma paragem da sua destruição pelo sistema imunitário. (166)

Tendo em conta as propriedades imunomoduladoras das CECU, diversos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de afirmar a efetividade destas células na regulação da resposta imunitária (diminuição da resposta inflamatória e supressão da atividade dos linfócitos T e da conseqüente destruição das células  $\beta$  pancreáticas), bem como na proteção e promoção da sua diferenciação em células  $\beta$  funcionais dos ilhéus pancreáticos. (167–169)

Dado o potencial das células T para regular a resposta autoimune, presente na Diabetes *mellitus* tipo 1, o recurso crescente a essas células, isolando-as a partir do sangue do CU, conduziu ao desenvolvimento de estudos, *in vitro*, que viabilizaram a expansão das células T reguladoras, a partir do sangue do CU previamente criopreservado, em quantidade suficiente para aplicação terapêutica, embora careçam de um ensaio clínico que suporte tais resultados. (170)

#### Doença inflamatória intestinal

A doença inflamatória intestinal engloba duas patologias: a colite ulcerosa e a DC. Embora a sua etiologia não se encontre totalmente estabelecida, sabe-se que fatores genéticos, ambientais e imunológicos contribuem para a ocorrência da doença inflamatória do intestino, que pressupõe um comprometimento na interação dinâmica entre a microbiota intestinal, a mucosa intestinal e o sistema imunitário do hospedeiro. (171) As CEM provenientes de diferentes fontes, incluindo o CU, têm sido extensivamente estudadas como agentes terapêuticos atraentes, já que induzem um aumento da produção de *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) pelos macrófagos, responsável pela reparação do tecido intestinal. (171,172) Para além das propriedades regenerativas, as CEM exibem ainda propriedades imunomoduladoras e capacidade de se diferenciarem em células epiteliais, favorecendo a cicatrização dos tecidos afetados pela doença. (171)

### **Psoríase**

Enquanto doença crônica e autoimune da pele, a psoríase caracteriza-se pelo aparecimento de lesões avermelhadas e escamosas, de etiologia e tratamento ainda desconhecidos. (173,174) A prevenção e o tratamento das lesões, em períodos de exacerbação, têm constituído o foco de atuação nesta patologia, para o qual as CEM do CU concorrem. (173) Os resultados de estudos, realizados em modelos animais, têm revelado uma diminuição significativa da inflamação da pele e uma consequente supressão dos sinais e sintomas decorrentes da psoríase, quando administradas CEM do CU em modelos psoriáticos. Na base da resposta terapêutica favorável das CEM do CU está a sua migração para o local das lesões cutâneas e a capacidade de regulação de mecanismos imunitários e de efeitos hormonais parácrinos. (175,176)

### **Lúpus eritematoso sistémico**

O LES é uma doença crônica multissistémica que compromete o normal funcionamento do sistema imunitário, caracterizando-se pela produção de autoanticorpos e pela formação e deposição de complexos imunes em múltiplos tecidos que, em última instância, originam inflamação, dor e destruição de diversos órgãos. (177,178) A ausência de resposta ao tratamento convencional, num elevado número de doentes, tem conduzido à pesquisa de novas opções terapêuticas. Embora o benefício das CEH no transplante de doenças autoimunes seja reconhecido, a sua aplicabilidade terapêutica não se estende ao LES. Neste caso, são as CEM do CU que têm assumido o papel principal, sendo amplamente estudadas e caracterizadas como uma fonte alternativa de propriedades imunomoduladoras, imunossupressoras e regenerativas. Ensaio pré-clínicos revelaram a efetividade do transplante alogénico de CEM na inibição da progressão da doença e no prolongamento da vida dos modelos animais. (179) O acompanhamento, a longo prazo, de doentes com LES, submetidos a transplante alogénico de CEM da MO, em alguns casos, e do tecido do CU, noutros casos, revelou a segurança e eficácia destas células na remissão clínica da doença e na recuperação da função dos órgãos afetados. (178,180)

### **Artrite reumatoide**

Uma das doenças autoimunes mais comuns que afeta as articulações é a AR. (181) Na base da imunopatogénese da AR está um desequilíbrio entre a resposta imune das células pró-inflamatórias T *helper*17 e das células anti-inflamatórias T reguladoras, sendo que, à semelhança das patologias abordadas anteriormente, também na AR as CEM constituem a nova estratégia terapêutica na reparação e regeneração dos tecidos afetados, pela sua capacidade de modular a resposta imunológica (alteração da frequência e função dos linfócitos de memória e promoção da geração de células T reguladoras). (181,182) Embora a identificação de uma terapia bem-sucedida requeira uma maior pesquisa, um ensaio clínico, que pretendeu avaliar a tolerância, segurança e eficácia da utilização de CEM do sangue do CU, em humanos, revelou uma diminuição da inflamação e uma redução da dor. (183) Recentemente, um outro ensaio clínico desenvolvido em modelo animal, com 3 administrações intravenosas de CEM do sangue do CU, espaçadas por intervalos de 2 semanas, em diferentes doses, reforçou os efeitos terapêuticos e as capacidades anti-inflamatórias destas células no modelo *in vivo* de AR. (184)



#### 10.2.4. Doenças ortopédicas e cartilagíneas

Um dos problemas mais comuns na prática ortopédica é a lesão do tecido ósseo e cartilagíneo. A engenharia dos tecidos está, constantemente, a propor abordagens inovadoras, no sentido de melhorar o reparo do osso e da cartilagem, já que as opções terapêuticas atuais possuem limitações e desvantagens, como a disponibilidade limitada do tecido cartilagíneo ou a presença de tecido ósseo acelular. A fim de superar essas adversidades, a utilização de CE, obtidas a partir do sangue e tecido do CU, assumiu um interesse crescente, pela capacidade destas células se diferenciarem em condrócitos ou osteócitos. (185,186)

Marmotti A. *et al.* avaliaram, num estudo *in vitro*, a capacidade de CEM do CU alogénicas se diferenciarem na via condrogénica e osteogénica, em ambiente tridimensional, tendo então constatado a sua relevância clínica em cirurgias reconstitutivas do osso e da cartilagem, bem como o seu valor promissor na presença de um meio condrogénico hipertrófico. (185)

O tratamento da osteonecrose da cabeça do fémur (ONCF), patologia caracterizada pela morte do tecido ósseo, em consequência da privação do fluxo sanguíneo, é exemplo de outra das abordagens promissoras das CEM do tecido do CU. Resultados decorrentes de um ensaio clínico, realizado em 9 doentes com ONCF, sugeriram que a infusão de CEM do tecido do CU, em fase inicial da doença, é um método viável e relativamente seguro para o tratamento da patologia, já que ocorre uma promoção da irrigação sanguínea, pela capacidade destas células se diferenciarem em células endoteliais capazes de regenerar vasos sanguíneos, bem como uma reparação e reconstrução da área morta da cabeça do fémur, pela diferenciação destas células em osteoblastos. (187)

A destruição progressiva da cartilagem articular, resultante de traumas, tumores ou outras patologias, aliada à sua capacidade limitada de autorregeneração constitui a base de doenças degenerativas da cartilagem, das quais se destaca a osteoartrite, também designada por osteoartrose. (186,188,189) Embora a osteoartrite careça de cura, também nesta patologia as CEM do CU têm sido promissoras no alívio de sintomas e na interrupção da progressão da doença. A regeneração das lesões cartilagíneas, a partir de CEM do tecido do CU, foi observada por Zhang *et al.*, num estudo conduzido em caprinos com lesões na cartilagem do côndilo femural, já que estas células apresentam baixa imunogenicidade, capacidade de diferenciação em condrócitos e de regulação de mecanismos inflamatórios. (186) Um ensaio clínico recentemente desenvolvido por Matas J. *et al.* reforça, igualmente, que a administração, neste caso local e repetida, de CEM do tecido do CU é segura e capaz de reduzir a dor em doentes com osteoartrite do joelho, de uma forma mais eficaz e duradoura do que o tratamento com ácido hialurónico, podendo, então, constituir uma viável opção terapêutica futura. (190)

#### 10.2.5. Regeneração de feridas

O crescimento acelerado da prevalência de feridas crónicas (191), aliado à ineficaz cicatrização das mesmas após cirurgia e à indisponibilidade de fármacos capazes de dar resposta a este quadro clínico, levou à necessidade de desenvolver pesquisas para obter melhores opções terapêuticas (192), sendo que as CEM, isoladas ou em associação com

outras terapêuticas, se assumiram como uma das opções mais promissoras. (193) Assim sendo, as CEM de diferentes etiologias, incluindo o tecido do CU, são atualmente estudadas na reparação e regeneração da pele, perante feridas cutâneas graves, essencialmente provenientes da exposição à radiação ou em indivíduos diabéticos. (194)

O principal mecanismo, pelo qual as CEM do CU proporcionam um microambiente favorável à regeneração de vários tipos de feridas, baseia-se na expressão regulada de determinados fatores (ex: fatores de crescimento) que induzem a secreção de moléculas biológicas com atividade imunossupressora, anti-inflamatória e indutora do trofismo celular (inibição da apoptose e estimulação da angiogénese e da mitose celular dos tecidos). (191,195)

A eficácia de CEM no tratamento de úlceras causadas por radiação foi testada por Jin *et al.* que, ao associarem estas células a fatores de crescimento derivados de plaquetas, observaram uma cicatrização mais rápida e uma deposição de colagénio mais organizada no tecido lesado do que a observada quando se utilizam, isoladamente, estes componentes. (196)

Igualmente, a inexistência de medidas terapêuticas efetivas em feridas diabéticas, como a úlcera do pé diabético, tem contribuído para o uso de CEM do CU nessas situações. O benefício destas células na cicatrização de feridas diabéticas, tendo em conta a segurança e eficácia comprovadas em ensaios pré-clínicos e clínicos, deve-se à sua capacidade de secretar citocinas, que promovem o recrutamento celular, a remodelação da matriz extracelular e a angiogénese, assim como a sua diferenciação em células endoteliais e queratinócitos. (197,198) Whiteley J. *et al.* avaliaram, *in vivo*, o benefício terapêutico decorrente da aplicação tópica de CEM do sangue do CU, expandidas por cultura, em feridas diabéticas de ratos, tendo observado uma aceleração no processo de regeneração celular, face ao grupo controlo não tratado. Para além do efeito terapêutico resultante do enxerto direto, foi ainda observável o contributo dos mecanismos de sinalização parácrina, subjacentes às CEM, para a regeneração tecidual, já que esta foi mantida após as células serem eliminadas. (199)

#### **10.2.6. Produção de componentes sanguíneos**

A produção, *in vitro*, de concentrados de eritrócitos a partir de CE tem sido considerada uma opção para ultrapassar a escassez de sangue disponível para transfusões, estimada pela Organização Mundial de Saúde, no futuro. O sangue do CU, pela sua acessibilidade e elevada concentração de CE, constitui uma ótima fonte para o desenvolvimento deste tipo de metodologia. Diversos estudos têm sido realizados, sendo que um grupo de investigadores desenvolveu uma metodologia que possibilita a multiplicação das células do sangue do CU e posterior diferenciação em eritrócitos. A segurança e funcionalidade dos eritrócitos produzidos, *in vitro*, foi também demonstrada pelos investigadores em modelo animal, o que fornece evidência de que a eventual escassez de unidades de sangue para transfusão poderá ser ultrapassada. A produção de componentes sanguíneos, em larga escala, aliada ao desenvolvimento de ensaios clínicos, em humanos, são vistos como pontos fulcrais para antever a entrada e o consequente benefício destes produtos na prática clínica. (200)

## **11. Conclusões e perspectivas futuras**

Os resultados da investigação de CECU conquistados, até ao momento, têm refletido um forte potencial terapêutico destas células. Nos últimos anos, o crescente interesse dos investigadores nesta área tem conduzido a avanços significativos, sustentados pelo sonho de uma medicina regenerativa.

Desde 1988, ano em que foi realizado o primeiro transplante de sangue do CU, que esta estrutura física deixou de ser vista como um mero excedente do parto, passando a ser reconhecida como uma relevante fonte de CE, cujo campo de aplicação ainda se desconhece na sua totalidade. Os estudos atuais têm permitido concluir que o avanço da linha temporal é acompanhado por um aumento do espectro de aplicações clínicas das CECU, sendo o uso destas células reconhecido como uma alternativa terapêutica bem sucedida às CE provenientes quer da MO, quer do sangue periférico. Entre as principais vantagens que motivam o uso de CECU estão a ausência de riscos para a mãe e para o bebé no momento da colheita, a menor exigência no perfil de compatibilidade HLA, comparativamente ao requerido em transplantes de CE da MO, o menor risco de DECH e a existência de CE mais primitivas. Contudo, é igualmente de realçar que a reduzida quantidade de CE isoladas a partir do CU constitui a principal limitação desta fonte celular, refletindo-se numa reconstituição imunitária mais lenta após transplantação, comparativamente à observada com CE da MO. Deste modo, a recolha futura de CECU em quantidade suficiente, a fim de se assistir a um sucesso terapêutico na prática clínica, tão rápido quanto o observado com CE da MO, constitui um desafio da ciência. Mas as limitações das CECU não se ficam por aqui, pois, ainda que o seu uso seja reconhecido por inúmeros estudos como vantajoso em terapia genética, este não é isento de efeitos adversos que poderão ser potencialmente graves, já que o recurso a potenciais vetores bacterianos e/ou virais pode resultar em infeções e reações alérgicas graves que culminam, por sua vez, num sério compromisso do sistema imunitário. Apesar disso, as características únicas das CECU (capacidade de diferenciação e autorrenovação) e as inúmeras vantagens inerentes ao seu uso têm-se realçado e atraído a atenção dos mais curiosos, resultando nos progressos científicos hoje conhecidos. Reconhecer mais benefícios e novas capacidades das CECU, bem como aumentar o seu uso no tratamento de quadros fisiopatológicos atualmente desconhecidos, é a esperança para o seu uso futuro. Muitas expectativas têm sido colocadas no uso de CEH e CEM do CU para o tratamento de doenças do sistema nervoso, onde se destaca o autismo e a PC, já que a crescente incidência destas patologias na população assim o justifica. A capacidade das CECU se diferenciarem em células neurais constitui uma das mais recentes descobertas neste âmbito, e tem motivado investimento científico, com o intuito de dar resposta a patologias do foro neurológico.

Mas nem só as células do sangue do CU têm revelado resultados promissores na investigação de aplicações terapêuticas. Também as CE do tecido do CU, pelo seu potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, facilidade de acesso, propriedades imunossupressoras e capacidade de migração para locais de lesão tecidual, têm sido foco de entusiasmo, por parte de muitos investigadores, na possibilidade de controlo de muitas patologias graves, essencialmente, no ramo da medicina regenerativa. As investigações atuais de CEM do tecido do CU têm oferecido uma compreensão, cada vez maior, das características destas células e, por isso, uma maior compreensão da sua potencial aplicação terapêutica a doenças neurológicas, cardiovasculares, autoimunes, ortopédicas e

cartilagíneas, assim como na cicatrização de feridas e na produção de componentes sanguíneos. Todavia, acredita-se que a investigação contínua destas células e o seu conhecimento aprofundado resulte, ainda, na extensão da aplicação clínica das CEM a outros contextos patológicos. Ao entender, completamente, as características e o modo de ação das CEM muitas terapias inovadoras poderão surgir.

Ainda que a importância terapêutica das CECU seja, atualmente, reconhecida em diversos contextos, considera-se uma necessidade e um desafio futuro a padronização do tratamento de certas doenças com CECU que se encontram, até agora, em fase de ensaios clínicos, assim como a continuidade da investigação que se encontra em fase experimental e que, por isso, carece, ainda, da comprovação do benefício terapêutico destas células em determinadas doenças. Em Portugal, o desenvolvimento desta área tem sido, em muito, sustentado por bancos privados de criopreservação de CECU, onde a Crioestaminal assume um lugar de destaque, pela notável investigação associada a terapias celulares que tem desenvolvido e, subsequentemente, pelas novas aplicações terapêuticas que tem encontrado nas CECU. É de destacar que, na base do sucesso desta aposta da Crioestaminal, estão as parcerias que este banco tem firmado com instituições académicas e científicas de renome. E o lugar de destaque na investigação e conhecimento acrescido das potencialidades terapêuticas das CECU é atribuído aos bancos privados, já que o banco público português, segundo confessou o ex-presidente do Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida, Miguel Oliveira e Silva, ao *Jornal Público*, em 2016, *“está a funcionar muitíssimo mal”*. *“Há insuficiências que se arrastam há anos, o que é objetivamente uma forma, creio que involuntária, de favorecer os privados. Se o banco do Estado funcionasse bem, os privados não poderiam fazer a propaganda que fazem, quase culpabilizando a grávida que não paga para criopreservar o sangue”*.

O facto de muitos ensaios clínicos estarem limitados ao modelo animal suscita, igualmente, um outro desafio futuro: o de desenvolver mais investigação com CECU na espécie humana, já que a transposição de resultados entre espécies nem sempre é linear, pois existem marcadores únicos e exclusivos de espécie.

No que concerne aos bancos de criopreservação de CECU, Portugal suporta algumas lacunas, essencialmente a nível do BPCCU. Dada a importância dos bancos públicos, cuja ligação em rede possibilita o acesso global a amostras criopreservadas segundo altos padrões de qualidade, apostar na consolidação deste tipo de bancos altruístas é uma prioridade, onde Portugal parece pecar. E peca, não só pelo número limitado de locais disponíveis para a realização da colheita de amostras (apenas quatro em todo o país), como também na escassez de comunicação e divulgação de informação respeitante à existência do BPCCU. Neste âmbito, há ainda um longo caminho a traçar em Portugal, já que a existência do banco público é desconhecida por muitos pais, o que poderá justificar o reduzido número de doações altruístas registadas e, conseqüentemente, a não certificação internacional deste banco. Apostar na comunicação social e nos profissionais de saúde para dar a conhecer, de forma transparente, à população portuguesa, a existência, as primazias e as eventuais limitações do BPCCU é um desafio do futuro, sempre direccionado para o benefício da sociedade.

Embora as CECU tenham, atualmente, afirmado o seu benefício em muitos contextos patológicos, os desenvolvimentos e descobertas conquistadas até hoje continuam a aguçar as expectativas dos cientistas. Muitos acreditam que a investigação das CECU poderá revolucionar, num futuro próximo, a forma de tratamento de muitas doenças até hoje fatais, sem terapia eficazmente reconhecida. A verdade é que a velocidade atual do progresso

científico nesta área, tem aberto as portas à esperança de uma maior e melhor qualidade de vida e de uma maior longevidade humana.

## **12. Referências bibliográficas**

1. Crioestaminal. Tudo sobre as células estaminais [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2019 [cited 2019 Mar 8]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/celulas-estaminais/>
2. Bebevida. Células estaminais: como são classificadas [Internet]. Porto: Bebevida; [cited 2019 Mar 9]. Available from: <https://bebevida.com/pt/celulas-estaminais/como-sao-classificadas>
3. BebêCord. Células estaminais [Internet]. Porto, Lisboa: BebéCord; [cited 2019 Mar 8]. Available from: <http://www.bebecord.pt/celulas-estaminais/>
4. Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 16];36(4):1111–26. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.011>
5. Crioestaminal. O potencial das células estaminais do tecido do cordão umbilical [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2019 [cited 2019 Mar 23]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/potencial-celulas-estaminais-tecido-cordao-umbilical/>
6. Criovida. O que são células estaminais? [Internet]. Porto: Criovida; 2019 [cited 2019 Mar 10]. Available from: <http://www.criovida.pt/celulas-estaminais/>
7. Crioestaminal. Células progenitoras [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2019 [cited 2019 Mar 12]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/glossary/celulas-progenitora/>
8. Marchetti V, Peters C. Endothelial Progenitor Cells and Endothelial Cells. *Stemcell Technol* [Internet]. 2015 [cited 2019 Mar 29];1:1–4. Available from: [https://cdn.stemcell.com/media/files/minireview/MRDX20360-Endothelial\\_Progenitor\\_Cells\\_Endothelial\\_Cells.pdf?\\_ga=2.96911327.1314205324.1562700869-993714570.1553878759](https://cdn.stemcell.com/media/files/minireview/MRDX20360-Endothelial_Progenitor_Cells_Endothelial_Cells.pdf?_ga=2.96911327.1314205324.1562700869-993714570.1553878759)
9. Mou Y, Yue Z, Zhang H, Shi X, Zhang M, Chang X, et al. High quality in vitro expansion of human endothelial progenitor cells of human umbilical vein origin. *Int J Med Sci* [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 29];14(3):294–301. Available from: <http://doi.org/10.7150/ijms.18137>
10. Fallahi-Sichani M, Soleimani M, Najafic SMA, Kiani J, Arefian E, Atashi A. In vitro differentiation of cord blood unrestricted somatic stem cells expressing dopamine-associated genes into neuron-like cells. *Cell Biol Int* [Internet]. 2007 [cited 2019 Mar 23];31(3):299–303. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.11.011>
11. Behjani ZZ, Ai J, Soleimani M, Atashi A, Taheri B, Ebrahimi-Barough S, et al. Human

- unrestricted somatic stem cells ameliorate sepsis - related acute lung injury in mice. *J Cell Physiol* [Internet]. 2019 [cited 2019 Mar 30];234(8):13942–50. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcp.28077>
12. Cabeleira A, Vieira M, Matos T. O sangue do cordão umbilical em medicina regenerativa: uma revisão dos avanços científicos mais recentes. *Acta Obs Ginecol Port* [Internet]. 2010 [cited 2019 Mar 24];4(2):81–7. Available from: [http://www.fspog.com/fotos/editor2/2010-2\\_artigo\\_de\\_revisao\\_1.pdf](http://www.fspog.com/fotos/editor2/2010-2_artigo_de_revisao_1.pdf)
  13. Kaushik A, Bhartiya D. Pluripotent Very Small Embryonic-Like Stem Cells in Adult Testes – An Alternate Premise to Explain Testicular Germ Cell Tumors. *Stem Cell Rev Reports* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 30];14(6):793–800. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12015-018-9848-3>
  14. Amouzegar A, Dey BR, Spitzer TR. Peripheral Blood or Bone Marrow Stem Cells? Practical Considerations in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transfus Med Rev* [Internet]. 2019 [cited 2019 Apr 14];33(1):43–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2018.11.003>
  15. Azzopardi JI, Blundell R. Review: Umbilical Cord Stem Cells. *Stem Cell Discov* [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 14];8(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.4236/scd.2018.81001%0A>
  16. Sequeiros J, Neves MCP. Relatório sobre os bancos de sangue do cordão umbilical, tecido do cordão umbilical e placenta [Internet]. Lisboa: Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida; 2012 [cited 2019 Jun 2]. Available from: [http://www.cneqv.pt/admin/files/data/docs/1356002786\\_RelatorioFinal-Parecer67-SCU.pdf](http://www.cneqv.pt/admin/files/data/docs/1356002786_RelatorioFinal-Parecer67-SCU.pdf)
  17. Mitrossili M, Sarris M, Nikolados Y. Ethical and Legal Issues in Cord Blood Stem Cells and Biobanking. In: Stavropoulos-Giokas C, Charron D, Navarrete C, editors. *Cord Blood Stem Cells and Regenerative Medicine*. Academic P. Cambridge: Elsevier Inc.; 2015. p. 313–24.
  18. Regateiro F, Soares J, Lobo Antunes J, Fevereiro P, Cabral R. Relatório sobre investigação em células estaminais. *Cons Nac Ética para as Ciências da Vida* [Internet]. 2005 [cited 2019 Jun 23]; Available from: [http://www.cneqv.pt/admin/files/data/docs/1273054467\\_P047\\_RelatorioCE\\_VersaoFinal.pdf](http://www.cneqv.pt/admin/files/data/docs/1273054467_P047_RelatorioCE_VersaoFinal.pdf)
  19. Ramos A. Investigação com células estaminais – abordagem ética. *Rev Lusófona Ciência e Med Veterinária* [Internet]. 2008 [cited 2019 Jun 23];2:29–32. Available from: [http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/475/rev\\_3.pdf?sequence=1](http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/475/rev_3.pdf?sequence=1)
  20. Bebevida. Aplicações terapêuticas e potencial terapêutico [Internet]. Porto: Bebevida; [cited 2019 Jun 4]. Available from: <https://bebevida.com/pt/celulas-estaminais/aplicacoes-terapeuticas>

21. Crioestaminal. Aplicações atuais [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2019 [cited 2019 Jun 4]. Available from: <http://www.crioestaminal.pt/aplicacoes-atuais/>
22. BebéCord. Criopreservação [Internet]. Porto, Lisboa: Bebécord; [cited 2019 Jun 4]. Available from: <https://www.bebecord.pt/celulas-estaminais/>
23. International Society for Stem Cell Research. Stem Cells Facts [Internet]. Old Orchard Road, Los Angeles: ISSCR; 2019 [cited 2019 Mar 14]. 1-6 p. Available from: <https://www.closerlookatstemcells.org/wp-content/uploads/2018/10/stem-cell-facts.pdf>
24. National Institutes of Health. Stem Cell Information [Internet]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services; 2016 [cited 2019 Mar 9]. Available from: <https://stemcells.nih.gov/info/basics/1.htm>
25. Bragança J, Tavares A BJ. Células estaminais e medicina regenerativa, um admirável mundo novo. Rev da Soc Port Bioquímica Canal BQ [Internet]. 2010 [cited 2019 Mar 14];7:4–17. Available from: [https://www.academia.edu/14104197/Células\\_estaminais\\_e\\_medicina\\_regenerativa\\_-\\_Um\\_admirável\\_mundo\\_novo](https://www.academia.edu/14104197/Células_estaminais_e_medicina_regenerativa_-_Um_admirável_mundo_novo)
26. Morrison SJ, Spradling AC. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. Cell [Internet]. 2008 [cited 2019 Mar 15];132(4):598–611. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.038>
27. Soritau O, Girlovanu M, Susman S, Constantin A-M, Rus-Ciucă D, Miha CM, et al. Stem Cells - biological update and cell therapy progress. Clujul Med [Internet]. 2015 [cited 2019 Mar 15];88(3):265–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.15386/cjmed-483>
28. Yourgenome WGC. What is a stem cell? [Internet]. Facts; 2017 [cited 2019 Mar 9]. Available from: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-a-stem-cell>
29. Balbi C, Bollini S. Fetal and perinatal stem cells in cardiac regeneration: Moving forward to the paracrine era. Placenta [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 16];59:96–106. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.04.008>
30. Joerger-Messerli MS, Marx C, Oppliger B, Mueller M, Surbek D V., Schoeberlein A. Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly and Amniotic Fluid. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 16];31:30–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2015.07.006>
31. Ziaei M, Zhang J, Patel D V., McGhee CNJ. Umbilical cord stem cells in the treatment of corneal disease. Surv Ophthalmol [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 16];62(6):803–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2017.02.002>
32. Murnaghan I. Pluripotent Stem Cells [Internet]. Explore Stem Cells; 2018 [cited 2019 Mar 10]. Available from: <http://www.explorestemcells.co.uk/PluripotentStemCells.html>
33. Murnaghan I. Multipotent stem cell [Internet]. Explore Stem Cells; 2019 [cited 2019 Mar



- 10]. Available from: <http://www.explorestemcells.co.uk/MultipotentStemCells.html>
34. Murnaghan I. Unipotent stem cell [Internet]. Explore Stem Cells; 2018 [cited 2019 Mar 10]. Available from: <http://www.explorestemcells.co.uk/UnipotentStemCells.html>
35. Biology. What is the difference between “lineage restriction” and “differentiated” in terms of stem cell biology [Internet]. Stack Exchange Inc.; 2013 [cited 2019 Mar 9]. Available from: <https://biology.stackexchange.com/questions/10015/what-is-the-difference-between-lineage-restriction-and-differentiated-in-ter?rq=1>
36. Correia L. Células estaminais pluripotentes induzidas no estudo de mecanismos de doença e avaliação de novas terapias [Internet] [master's thesis]. [Coimbra]: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; 2013 [cited 2019 Mar 16]. Available from: <http://hdl.handle.net/10316/25942>
37. Vitale AM, Wolvetang E, MacKay-Sim A. Induced pluripotent stem cells: A new technology to study human diseases. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2011 [cited 2019 Mar 16];43(6):843–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.03.013>
38. Balan S, Toyoshima M, Yoshikawa T. Contribution of induced pluripotent stem cell technologies to the understanding of cellular phenotypes in schizophrenia. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 17];1–18. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.04.021>
39. Maillacheruvu PF, Engel LM, Crum IT, Agrawal DK, Peeples ES. From cord to caudate: Characterizing umbilical cord blood stem cells and their paracrine interactions with the injured brain. *Pediatr Res* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 29];83(1–2):205–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2017.251>
40. Mossahebi-Mohammadi M, Atashi A, Kaviani S, Soleimani M. Efficient expansion of SALL4–transduced umbilical cord blood derived CD133+hematopoietic stem cells. *Acta Med Iran* [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 29];55(5):290–6. Available from: <http://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/6161>
41. Dessels C, Alessandrini M, Pepper MS. Factors Influencing the Umbilical Cord Blood Stem Cell Industry: An Evolving Treatment Landscape. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 29];7(9):643–50. Available from: <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0244>
42. Mark L. Weiss, Troyer DL. Stem Cells in the Umbilical Cord. *Stem Cells Rev* [Internet]. 2013 [cited 2019 Mar 29];2(2):155–62. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12015-006-0022-y>
43. Pineault N, Abu-Khader A. Advances in umbilical cord blood stem cell expansion and clinical translation. *Exp Hematol* [Internet]. 2015 [cited 2019 Mar 24];43(7):498–513. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2015.04.011>
44. Bello AB, Park H, Lee SH. Current approaches in biomaterial-based hematopoietic stem

- cell niches. *Acta Biomater* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 28];72:1–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.028>
45. Hoffbrand AV, Moss PAH. Haemopoiesis. In: John Wiley & Sons Ltd, editor. *Hoffbrand's Essential Haematology*. 7th ed. Nova Jersey, EUA: Wiley-Blackwell; 2016. p. 1–10.
  46. Nonnemacher MR, Quiterio S, Allen AG, Mele AR, Pirrone V, Wigdahl B. Myelomonocytic Cell Lines in Modeling HIV-1 Infection of the Bone Marrow. In: Ghosh A, editor. *Biology of Myelomonocytic Cells*. 1th ed. London: InTechOpen Limited; 2017. p. 129–62.
  47. Sigma-Aldrich. Hematopoietic Stem and Immune Cell Culture [Internet]. Darmstadt, Germany: Merck KGaA; 2019 [cited 2019 Apr 26]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/stem-cell-biology/hematopoietic-stem-cell.html>
  48. Castro-Manrreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *J Immunol Res* [Internet]. 2015 [cited 2019 Mar 27];2015:394917. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/394917>
  49. Zayed M, Adair S, Ursini T, Schumacher J, Misk N. Concepts and challenges in the use of mesenchymal stem cells as a treatment for cartilage damage in the horse. *Res Vet Sci* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 27];118:317–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.03.011>
  50. Gugliandolo A, Bramanti P, Mazzon E. Mesenchymal stem cell therapy in Parkinson's disease animal models. *Curr Res Transl Med* [Internet]. 2017 [cited 2019 Mar 27];65(2):51–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.retram.2016.10.007>
  51. Mudyanadzo TA. Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Correlates. *Cureus* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 29];10(9):1–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6248662/>
  52. Hou Y, Li C. Stem/Progenitor Cells and Their Therapeutic Application in Cardiovascular Disease. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 29];6:139. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00139>
  53. O'Brien T, Liew A, Creane M, Lyons CJ, Keighron C. Recent Advances in Endothelial Progenitor Cells Toward Their Use in Clinical Translation. *Front Med* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 29];5:354. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00354>
  54. Santourlidis S, Wernet P, Ghanjati F, Graffmann N, Springer J, Kriegs C, et al. Unrestricted somatic stem cells (USSC) from human umbilical cord blood display uncommitted epigenetic signatures of the major stem cell pluripotency genes. *Stem Cell Res* [Internet]. 2011 [cited 2019 Mar 30];6(1):60–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2010.08.003>
  55. Aktas M, Buchheiser A, Houben A, Reimann V, Radke T, Jeltsch K, et al. Good

- manufacturing practice-grade production of unrestricted somatic stem cell from fresh cord blood. *Cytotherapy* [Internet]. 2010 [cited 2019 Mar 30];12(3):338–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/14653241003695034>
56. Vieira M, Gomes L, Castelo-Branco G, Santos R. A importância crescente do cordão umbilical – desafios actuais da terapia com células estaminais. *Acta Obs Ginecol Port* [Internet]. 2007 [cited 2019 Mar 30];1(4):185–8. Available from: [http://www.fspog.com/fotos/editor2/1\\_ficheiro\\_239.pdf](http://www.fspog.com/fotos/editor2/1_ficheiro_239.pdf)
57. Baz H El, Demerdash Z, Kamel M, Atta S, Salah F, Hassan S, et al. Potentials of Differentiated Human Cord Blood-Derived Unrestricted Somatic Stem Cells in Treatment of Liver Cirrhosis. *Exp Clin Transplant* [Internet]. 2019 [cited 2019 Mar 30];17(2):251–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.6002/ect.2017.0249>
58. Ghanjati F, Santourlidis S. Effect on Multipotency and Phenotypic Transition of Unrestricted Somatic Stem Cells from Human Umbilical Cord Blood after Treatment with Epigenetic Agents. *Stem Cells Int* [Internet]. 2016 [cited 2019 Mar 30];2016:7643218. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7643218>
59. Farzamfar S, Ehterami A, Salehi M, Vaez A. Unrestricted Somatic Stem Cells Loaded in Nanofibrous Conduit as Potential Candidate for Sciatic Nerve Regeneration. *J Mol Neurosci* [Internet]. 2019 [cited 2019 Mar 30];67(1):48–61. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1209-9>
60. Zaehres H, Kogler G, Arauzo-bravo MJ, Bleidissel M, Santourlidis S, Weinhold S, et al. Induction of pluripotency in human cord blood unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol* [Internet]. 2010 [cited 2019 Mar 31];38(9):809–18. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2010.05.009>
61. Soleimani M, Khorsandi L, Atashi A, Nejaddehbashi F. Chondrogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Blood-Derived Unrestricted Somatic Stem Cells on A 3D Beta-Tricalcium Phosphate-Alginate-Gelatin Scaffold. *Cell J* [Internet]. 2014 [cited 2019 Mar 31];16(1):43–52. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3933438/>
62. Ratajczak MZ, Ratajczak J, Kucia M. Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSELs) - An Update and Future Directions. *Circ Res* [Internet]. 2019 [cited 2019 Mar 31];124(2):208–10. Available from: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.314287>
63. Kassmer SH, Krause DS. Very Small Embryonic-Like Cells: Biology and Function of These Potential Endogenous Pluripotent Stem Cells in Adult Tissues. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 2013 [cited 2019 Mar 31];80(8):677–90. Available from: <https://doi.org/10.1002/mrd.22168>
64. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Wojakowski W, Suszynska M, Mierzejewska K, Liu R, et al. Very small embryonic-like stem cells (VSELs) represent a real challenge in stem cell biology: recent pros and cons in the midst of a lively debate. *Leukemia* [Internet]. 2013 [cited 2019 Mar 31];28(3):473–84. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/leu.2013.255>

65. Ratajczak MZ. Mulhouse Strategy to Expand Ex Vivo Very Small Embryonic Like Stem Cells (VSELs) – Recent Study. *Stem Cell Rev Reports* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 31];14(4):461–2. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9827-8>
66. Lahlil R, Scrofani M, Barbet R, Tancredi C. VSELs Maintain their Pluripotency and Competence to Differentiate after Enhanced Ex Vivo Expansion. *Stem Cell Rev Reports* [Internet]. 2018 [cited 2019 Mar 31];14(4):510–24. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9821-1>
67. Canonica CM. An Overview of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Physician Assist Clin* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 13];1(3):409–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpha.2016.03.006>
68. Lima BA. Recrutamento de doadores voluntários de medula óssea no Norte de Portugal. *Acta Med Port* [Internet]. 2011 [cited 2019 Apr 13];24(S2):301–6. Available from: <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/1487/1073>
69. Dowse R, McLornan DP. Principles of haemopoietic stem cell transplantation. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 13];45(5):322–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.02.009>
70. Koniarczyk HL, Ferraro C, Miceli T. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *Semin Oncol Nurs* [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 13];33(3):265–78. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2017.05.004>
71. Drongelen V Van, Holoshitz J. Human Leukocyte Antigen – Disease Associations in Rheumatoid Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 13];43(3):363–76. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2017.04.003>
72. Widman A, Reshef R. Precision in donor selection: Identifying ideal stem-cell donors through their T cells. *Exp Hematol* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 13];44(11):1020–3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.07.013>
73. Jain T, Mesa RA, Palmer JM. Allogeneic Stem Cell Transplantation in Myelofibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 13];23(9):1429–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.05.007>
74. Michala L, Vlachopapadopoulou E, Tsimaris P, Papaioannou G, Paisiou A, Peristeri I, et al. Resolution of Hematocolpos in Adolescents Affected with Graft vs Host Disease. *J Pediatr Adolesc Gynecol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 13];31(5):536–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpag.2018.05.006>
75. Hymes SR, Alousi AM, Cowen EW. Graft-versus-host disease: Part I. Pathogenesis and clinical manifestations of graft-versus-host disease. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2012 [cited 2019 Apr 13];66(4):515.e1-515.e18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2011.11.960>

76. Balakrishnan A, Gloude N, Sasik R, Ball ED, Morris GP. Proinflammatory Dual Receptor T Cells in Chronic Graft- versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 13];23(11):1852–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.07.016>
77. Yu X, Liu L, Xie Z, Dong C, Zhao L, Zhang J. Bone marrow versus peripheral blood as a graft source for haploidentical donor transplantation in adults using post-transplant cyclophosphamide - A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2019 [cited 2019 Apr 14];133(2019):120–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.05.017>
78. Associação Portuguesa de Leucemias e Linfomas. Transplante Hematopoiético (Medula Óssea) [Internet]. APLL. 2017 [cited 2017 Apr 16]. Available from: <https://www.apll.org/doencas-e-tratamentos/tratamentos/transplante-hematopoietico/>
79. Bebevida. Fontes de células estaminais [Internet]. Porto: Bebevida; [cited 2019 Apr 20]. Available from: <https://bebevida.com/pt/celulas-estaminais/fontes-de-celulas-estaminais>
80. Yu Y-B, Song Y, Chen Y, Zhang F, Qi F-Z. Differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocytes in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep* [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 14];18(2):2009–16. Available from: <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9181>
81. Noroozi-Aghideh A, Kheirandish M. Human cord blood-derived viral pathogens as the potential threats to the hematopoietic stem cell transplantation safety: A mini review. *World J Stem Cells* [Internet]. 2019 [cited 2019 Apr 19];11(2):73–83. Available from: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i2.73>
82. Torabi T, Abroun S. Amniotic fluid, an effective factor for umbilical cord blood hematopoietic stem cells in cell culture: An approach for bone marrow transplantation. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2019 [cited 2019 Apr 19];58(2):169–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.01.001>
83. Rocha V. Umbilical cord blood cells from unrelated donor as an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation in children and adults. *Semin Hematol* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 20];53(4):237–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminhematol.2016.08.002>
84. Lecchi L, Giovanelli S, Gagliardi B, Pezzali I, Ratti I. An update on methods for cryopreservation and thawing of hemopoietic stem cells. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 27];54(3):324–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2016.05.009>
85. Arutyunyan I, Fatkhudinov T, Sukhikh G. Umbilical cord tissue cryopreservation: a short review. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 27];9:236. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0992-0>

86. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res* [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 27];6(1):12–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001>
87. Crioestaminal. Criopreservação [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2019 [cited 2019 Apr 26]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/criopreservacao/>
88. Dulugiac M, Moldovan L, Zarnescu O. Comparative studies of mesenchymal stem cells derived from different cord tissue compartments - The influence of cryopreservation and growth media. *Placenta* [Internet]. 2015 [cited 2019 Apr 27];36(10):1192–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2015.08.011>
89. Raffo D, Tito LP, Pes ME, Sasso DF. Evaluation of DMSO dextrose as a suitable alternative for DMSO dextran in cord blood cryopreservation. *VoxSanguinis* [Internet]. 2019 [cited 2019 Apr 27];114(3):283–9. Available from: <https://doi.org/10.1111/vox.12755>
90. Dimas-González J, Nieto-linares A, Millán-Rocha M, Salazar-Bailón JL, Lorenzo-Moreno BA, Rojo-Medina J. Thawing methods do not affect cell viability of CD45+ and CD34+ cells, but long-term cryopreservation of umbilical cord blood units generally decreases cell viability. *Transfus Apher Sci* [Internet]. 2019 [cited 2019 Apr 27];58(2):196–200. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.03.008>
91. Instituto Português do Sangue e da Transplantação. Criopreservação de sangue do cordão umbilical - Guia para os Pais [Internet]. Lisboa: IPST; 2015 [cited 2019 May 20]. Available from: [http://ipst.pt/files/TRANSPLANTACAO/BANCO\\_CORDAO/GuiaParaOsPais-CordaoUmbilical.pdf](http://ipst.pt/files/TRANSPLANTACAO/BANCO_CORDAO/GuiaParaOsPais-CordaoUmbilical.pdf)
92. Peberdy L, Young J, Massey DL, Kearney L. Parents' knowledge, awareness and attitudes of cord blood donation and banking options: an integrative review. *BMC Pregnancy Childbirth* [Internet]. 2018 [cited 2019 Apr 28];18:395. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12884-018-2024-6>
93. Roura S, Pujal J-M, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A. The role and potential of umbilical cord blood in an era of new therapies: a review. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2015 [cited 2019 Apr 28];6(1):123. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-015-0113-2>
94. Tuteja M, Agarwal M, Phadke SR. Knowledge of Cord Blood Banking in General Population and Doctors: A Questionnaire Based Survey. *Indian J Pediatr* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 28];83(3):238–41. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12098-015-1909-x>
95. Sun C, Yue J, He N, Liu Y, Zhang X, Zhang Y. Fundamental Principles of Stem Cell Banking. *Adv Exp Med Biol - Biobanking Cryopreserv Stem Cells* [Internet]. 2016 [cited 2019 May 4];951:31–45. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3_3)
96. Bebevida. Porquê criopreservar? [Internet]. Porto: Bebevida; [cited 2019 May 3].

Available from: <https://bebevida.com/pt/celulas-estaminais/porque-criopreservar>

97. Armson BA, Allan DS, Casper RF. Umbilical Cord Blood: Counselling, Collection, and Banking. *J Obstet Gynaecol Canada* [Internet]. 2015 [cited 2019 May 4];37(9):832–44. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1701-2163\(15\)30157-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1701-2163(15)30157-2)
98. Jawdat D. Banking of Human Umbilical Cord Blood Stem Cells and Their Clinical Applications. In: Abdelalim E, editor. *Recent Advances in Stem Cells - Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. New York: Cham, Humana Press; 2016. p. 159–77.
99. Spencer T, Jain D. Manufacturing of Regenerative Medicine Products. In: Atala A, Allickson JG, editors. *Translational Regenerative Medicine*. Cambridge: Academic Press; 2015. p. 199–210.
100. Crioestaminal. O processamento das amostras de sangue do cordão umbilical [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2019 [cited 2019 May 5]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/o-processamento-das-amostras-sangue-do-cordao-umbilical/>
101. Bebevida. O processo de criopreservação na Bebévída [Internet]. Porto: Bebevida; [cited 2019 May 5]. Available from: <https://bebevida.com/pt/celulas-estaminais/criopreservacao/processo>
102. Martinetti D, Colarossi C, Buccheri S, Denti G, Memeo L, Vicari L. Effect of trehalose on cryopreservation of pure peripheral blood stem cells. *Biomed Reports* [Internet]. 2017 [cited 2019 May 11];6(3):314–8. Available from: <https://doi.org/10.3892/br.2017.859>
103. Wrigley JD, McCall EJ, Bannaghan CL, Liggins L, Kendrick C, Griffen A, et al. Cell banking for pharmaceutical research. *Drug Discov Today* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 11];19(10):1518–29. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.05.006>
104. Yang H, Pidgorna A, Loutfy MR, Shuen P. Effects of interruptions of controlled-rate freezing on the viability of umbilical cord blood stem cells. *Transfusion* [Internet]. 2015 [cited 2019 May 11];55(1):70–8. Available from: <https://doi.org/10.1111/trf.12774>
105. Hunt CJ. Cryopreservation: Vitrification and Controlled Rate Cooling. In: Crook J, Ludwig T, editors. *Stem Cell Banking Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press; 2017. p. 41–77.
106. Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells. *Am J Hematol* [Internet]. 2007 [cited 2019 May 11];82(6):463–72. Available from: <https://doi.org/10.1002/ajh.20707>
107. Naaldijk Y, Friedrich-Stöckigt A, Sethe S, Stolzing A. Comparison of different cooling rates for fibroblast and keratinocyte cryopreservation. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2016 [cited 2019 May 11];10(10):354–64. Available from: <https://doi.org/10.1002/term.1815>

108. Imaizumi K, Nishishita N, Muramatsu M, Yamamoto T, Takenaka C, Kawamata S, et al. A Simple and Highly Effective Method for Slow-Freezing Human Pluripotent Stem Cells Using Dimethyl Sulfoxide, Hydroxyethyl Starch and Ethylene Glycol. *PLoS One* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 11];9(2):e88696. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088696>
109. Mayani H, Wagner JE, Broxmeyer HE. Cord blood research, banking, and transplantation: achievements, challenges, and perspectives. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2019 [cited 2019 May 25]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41409-019-0546-9>
110. Moore T, Brown MP, Chapman JR, Kramer J, Pfotenhauer RP, Brown HL. Newborn Stem Cell Banking Business Models. In: Atala A, Allickson JG, editors. *Translational Regenerative Medicine*. Cambridge: Academic Press; 2015. p. 75–83.
111. Hatcher HC, Atala A, Allickson JG. Landscape of Cell Banking. In: Atala A, Allickson JG, editors. *Translational Regenerative Medicine*. Cambridge: Academic Press; 2015. p. 13–9.
112. Ballen KK, Verter F, Kurtzberg J. Umbilical cord blood donation: public or private? *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2015 [cited 2019 May 26];50(10):1271–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2015.124>
113. Narayanan DL, Phadke SR. Concepts, Utility and Limitations of Cord Blood Banking: What Clinicians Need to Know. *Indian J Pediatr* [Internet]. 2019 [cited 2019 May 26];86(1):44–8. Available from: <http://doi.org/10.1007/s12098-018-2651-y>
114. Petrini C. Umbilical cord blood banking: from personal donation to international public registries to global bioeconomy. *J Blood Med* [Internet]. 2014 [cited 2019 May 26];5:87–97. Available from: <https://doi.org/10.2147/JBM.S64090>
115. CryoCell International. Private vs Public Banking [Internet]. Oldsmar, Florida: Cryocell International; [cited 2019 May 25]. Available from: <https://www.cryo-cell.com/cord-blood/private-vs-public-banking>
116. Instituto Português do Sangue e da Transplantação. Banco Público de Células do Cordão Umbilical: Apresentação [Internet]. Lisboa: SNS - IPST; 2017 [cited 2019 May 25]. Available from: <http://ipst.pt/index.php/banco-publico-de-celulas-do-cordao-umbilical/apresentacao>
117. Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Saúde Reprodutiva: Parto. Colheita de células estaminais do cordão umbilical [Internet]. Lisboa: DGS; 2017 [cited 2019 May 25]. Available from: <http://www.saudereprodutiva.dgs.pt/gestao-de-noticias/parto-colheita-de-celulas-estaminais-do-cordao-umbilical.aspx>
118. Faria N. Banco público de sangue do cordão umbilical ainda não chegou às 500 amostras [Internet]. Lisboa, Porto: Jornal Público; 2016 [cited 2019 May 25]. Available from: <https://www.publico.pt/2016/07/03/sociedade/noticia/banco-publico-de-sangue->



do-cordao-umbilical-ainda-nao-chegou-as-500-amostras-ao-fim-de-sete-anos-1736813

119. Maia A. Banco público pode avançar este ano para certificado internacional [Internet]. Lisboa, Porto, Coimbra: Diário de Notícias; 2017 [cited 2019 May 25]. Available from: <https://www.dn.pt/portugal/interior/banco-publico-pode-avancar-este-ano-para-certificado-internacional-6259006.html>
120. Instituto Português do Sangue e da Transplantação. Banco Público de Células do Cordão Umbilical: Doação de Sangue do Cordão Umbilical [Internet]. Lisboa: SNS - IPST; 2017 [cited 2019 May 25]. Available from: <http://ipst.pt/index.php/banco-publico-de-celulas-do-cordao-umbilical/doacao-de-sangue-do-cordao-umbilical>
121. Assembleia da República. Lei n.º 12/2009, de 26 de Março: Regime jurídico da qualidade e segurança relativa à dádava, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento, distribuição e aplicação de tecidos e células de origem humana. Diário da República [Internet]. 2009 [cited 2019 Jun 2];1ª série(60):1876–97. Available from: <https://dre.pt/application/dir/pdf1s/2009/03/06000/0187601897.pdf>
122. Eurocord. Who we are [Internet]. Paris: Eurocord; 2015 [cited 2019 May 26]. Available from: <http://www.eurocord.org/about-eurocord.php>
123. Eurocord. Mission and Vision [Internet]. Paris: Eurocord; 2015 [cited 2019 May 26]. Available from: <http://www.eurocord.org/eurocord-mission.php>
124. Faria N. Seis bancos privados e três empresas comerciais com milhares de amostras criopreservadas [Internet]. Lisboa, Porto: Jornal Público; 2016 [cited 2019 May 26]. Available from: <https://www.publico.pt/2016/07/03/sociedade/noticia/seis-bancos-privados-e-tres-empresas-comerciais-com-milhares-de-amostras-criopreservadas-1736841>
125. Crioestaminal. Experiência [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2019 [cited 2019 May 23]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/experiencia/>
126. Crioestaminal. Rigor [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2019 [cited 2019 May 23]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/rigor/>
127. Cabo AI. Bancos de células estaminais: A falta de legislação foi “inadmissível.” Bol da Ordem dos Advogados [Internet]. 2012 [cited 2019 Jun 2];87:21–3. Available from: <https://portal.oa.pt/comunicacao/publicacoes/boletim/edicoes-de-2012/>
128. Ministério da Saúde. Decreto-Lei n.º 124/2011, de 29 de Dezembro. Diário da República [Internet]. 2011 [cited 2019 Jun 2];1ª série(249):5491–8. Available from: <https://dre.pt/application/conteudo/145186>
129. Ministério da Saúde. Decreto regulamentar n.º 14/2012, de 26 de Janeiro. Diário da República [Internet]. 2012 [cited 2019 Jun 2];1ª série(19):480–2. Available from: <https://dre.pt/application/conteudo/544428>

130. Ministério da Saúde. Decreto-Lei n.º 39/2012, de 16 de Fevereiro. Diário da República [Internet]. 2012 [cited 2019 Jun 2];1ª série(34):791–3. Available from: <https://dre.pt/application/conteudo/543006>
131. Miguel-Berriain I. The ethics of stem cells revisited. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2015 [cited 2019 Jun 2];82–83:176–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.011>
132. Petrini C. Umbilical cord blood collection, storage and use: ethical issues. *Blood Transfus* [Internet]. 2010 [cited 2019 Jun 2];8(3):139–48. Available from: <http://doi.org/10.2450/2010.0152-09>
133. Assembleia da República. Lei n.º 24/2009, de 29 de Maio: Regime jurídico do Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida. Diário da República [Internet]. 2009 [cited 2019 Jun 2];Série I(104):1–3. Available from: [https://dre.pt/web/guest/legislacao-consolidada/-/lc/66647979/201808021434/exportPdf/normal/1/cacheLevelPage?\\_LegislacaoConsolidada\\_WAR\\_drefrontofficeportlet\\_rp=indice](https://dre.pt/web/guest/legislacao-consolidada/-/lc/66647979/201808021434/exportPdf/normal/1/cacheLevelPage?_LegislacaoConsolidada_WAR_drefrontofficeportlet_rp=indice)
134. Saleh R, Reza HM. Short review on human umbilical cord lining epithelial cells and their potential clinical applications. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 10];8:222–31. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0679-y>
135. Ding D-C, Chang Y-H, Shyu W-C, Lin S-Z. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant* [Internet]. 2015 [cited 2019 Jun 10];24(3):339–47. Available from: <https://doi.org/10.3727/096368915X686841>
136. Verter F, Couto PS. Clinical Trials and Family Banking of Perinatal Stem Cells. In: Atala A, Cetrulo KJ, Taghizadeh RR, Murphy S V., Cetrulo CL, editors. *Perinatal Stem Cells*. Cambridge: Academic Press; 2018. p. 321–36.
137. Crioestaminal. Criopreservação e o Futuro [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2019 [cited 2019 Jun 5]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/criopreservacao-e-o-futuro/>
138. Joo KM, Lee YE. Stem Cell - Based Gene Therapy in Neurological Disorders. In: Snider BJ, Li M, editors. *Gene Therapy in Neurological Disorders*. Cambridge: Academic Press; 2018. p. 81–94.
139. Encinas JM, Fitzsimons CP. Gene regulation in adult neural stem cells. Current challenges and possible applications. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 10];120:118–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.016>
140. Kumar A, Cox CSJ. Human Umbilical Cord as Treatment for Traumatic Brain Injury in Children. In: Atala A, Cetrulo KJ, Taghizadeh RR, Murphy S V., Cetrulo CLJ, editors. *Perinatal Stem Cells*. Cambridge: Academic Press; 2018. p. 249–55.
141. Kidani Y, Miki Y, Nomimura N, Minakawa S, Tanaka N, Miyoshi H, et al. The therapeutic

- effect of CD133+ cells derived from human umbilical cord blood on neonatal mouse hypoxic-ischemic encephalopathy model. *Life Sci* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 10];157:108–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.06.004>
142. Cotten CM, Murtha AP, Goldberg RN, Grotegut CA, Smith PB, Goldstein RF, et al. Feasibility of Autologous Cord Blood Cells for Infants with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *J Pediatr* [Internet]. 2014 [cited 2019 Jun 10];164(5):973–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.11.036>
143. Crioestaminal. Efeitos positivos da administração de células estaminais a doentes com lesões da espinal medula – resultados de um ensaio clínico [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2017 [cited 2019 Jun 6]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/efeitos-positivos-da-administracao-celulas-estaminais-doentes-lesoes-da-espinal-medula-resultados-um-ensaio-clinico/>
144. Gabel BC, Curtis EI, Marsala M, Ciacchi JD. A review of stem cell therapy for spinal cord injury: large animal models and the frontier in humans. *World Neurosurg* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 11];98:438–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2016.11.053>
145. Chhabra HS, Sarda K. Clinical translation of stem cell based interventions for spinal cord injury - Are we there yet? *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 11];120:41–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.021>
146. Crioestaminal. Potencial do Sangue do Cordão Umbilical no tratamento de Esclerose Lateral Amiotrófica [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2017 [cited 2019 Jun 7]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/potencial-do-sangue-do-cordao-umbilical-no-tratamento-esclerose-lateral-amiotrofica/>
147. Garbuzova-Davis S, Ehrhart J, Sanberg PR. Cord blood as a potential therapeutic for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 11];17(7):837–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14712598.2017.1323862>
148. Chen K, Feldman E. Stem Cell Therapy for Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: Boulis N, O'Connor D, Donsante A, editors. *Molecular and Cellular Therapies for Motor Neuron Diseases*. 1st ed. Cambridge: Academic Press; 2017. p. 207–31.
149. Guedes K, Pereira C, Pavan K, Valério BCO. Cross-cultural adaptation and validation of ALS Functional Rating Scale-Revised in Portuguese language. *Arq Neuropsiquiatr* [Internet]. 2010 [cited 2019 Jun 11];68(1):44–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2010000100010>
150. Shin JY, Park HJ, Kim HN, Oh SH, Bae J, Ha H, et al. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase  $\beta$ -amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy* [Internet]. 2014 [cited 2019 Jun 11];10(1):32–44. Available from: <https://doi.org/10.4161/auto.26508>
151. Cui Y, Ma S, Zhang C, Cao W, Liu M, Li D, et al. Human umbilical cord mesenchymal

- stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 12];320:291–301. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.12.021>
152. Darlington D, Li S, Hou H, Habib A, Tian J, Gao Y, et al. Human umbilical cord blood - derived monocytes improve cognitive deficits and reduce amyloid- $\beta$  pathology in PSAPP mice. *Cell Transplant* [Internet]. 2015 [cited 2019 Jun 12];24(11):2237–50. Available from: <https://doi.org/10.3727/096368915X688894>
153. Ehrhart J, Darlington D, Kuzmin-Nichols N, Sanberg CD, Sawmiller DR, Sanberg PR, et al. Biodistribution of infused human umbilical cord blood cells in Alzheimer's disease-like murine model. *Cell Transpl* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 15];25(1):195–9. Available from: <https://doi.org/10.3727/096368915X689604>
154. Crioestaminal. Células estaminais do tecido do cordão umbilical diminuem lesão neurológica em paralisia cerebral [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2018 [cited 2019 Jun 8]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/celulas-estaminais-do-tecido-do-cordao-umbilical-diminuem-lesao-neurologica-paralisia-cerebral/>
155. Kułak-Bejda A, Kułak P, Bejda G, Krajewska-Kułak E, Kułak W. Stem cells therapy in cerebral palsy: A systematic review. *Brain Dev* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 15];38(8):699–705. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2016.03.002>
156. Morioka C, Komaki M, Taki A, Honda I, Yokoyama N, Iwasaki K, et al. Neuroprotective effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on periventricular leukomalacia-like brain injury in neonatal rats. *Inflamm Regen* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 15];37:1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s41232-016-0032-3>
157. Lv Y-T, Zhang Y, Liu M, Qiuwaxi J, Ashwood P, Cho SC, et al. Transplantation of human cord blood mononuclear cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in autism. *J Transl Med* [Internet]. 2013 [cited 2019 Jun 15];11:196–206. Available from: <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-196>
158. Sivanesan S, Tan A, Jeyaraj R, Lam J, Gole M, Hardan A, et al. Pharmaceuticals and stem cells in autism spectrum disorders: wishful thinking? *World Neurosurg* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 15];98:659–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2016.09.100>
159. Zhang J, Wu Y, Chen A, Zhao Q. Mesenchymal stem cells promote cardiac muscle repair via enhanced neovascularization. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2015 [cited 2019 Jun 15];35(3):1219–29. Available from: <https://doi.org/10.1159/000373945>
160. Bagno L, Hatzistergos KE, Balkan W, Hare JM. Mesenchymal stem cell-based therapy for cardiovascular disease: progress and challenges. *Mol Ther* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 15];26(7):1610–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.05.009>

161. Cho H-M, Kim P-H, Chang H-K, Shen Y-M, Bonsra K, Kang B-J. Targeted genome engineering to control VEGF expression in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells: potential implications for the treatment of myocardial infarction. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 15];6(3):1040–51. Available from: <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0114>
162. Majka M, Sułkowski M, Badyra B. Regeneration of ischemic cardiovascular damage using Wharton's Jelly as an unlimited source of therapeutic stem cells. In: Atala A, Cetrulo KJ, Taghizadeh RR, Murphy S V., Cetrulo CLJ, editors. *Perinatal Stem Cells*. Cambridge: Academic Press; 2018. p. 281–9.
163. Roura S, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells: New therapeutic weapons for idiopathic dilated cardiomyopathy? *Int J Cardiol* [Internet]. 2014 [cited 2019 Jun 15];177(3):809–18. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.09.128>
164. Sterner RM, Sterner RC, Brenes-Salazar JA, Yu Ballard AC. Cellular therapies for chronic ischemic heart failure. *Int J Cardiol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 16];59(2):78–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijc.2018.01.010>
165. Abbaspanah B, Momeni M, Ebrahimi M, Mousavi SH. Advances in perinatal stem cells research: a precious cell source for clinical applications. *Regen Med* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 16];13(5):595–610. Available from: <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0019>
166. Crioestaminal. Expansão de células do sangue do cordão umbilical para tratamento da Diabetes tipo 1 [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2017 [cited 2019 Jun 10]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/expansao-celulas-do-sangue-do-cordao-umbilical-tratamento-da-diabetes-tipo-1/>
167. Sarang S, Viswanathan C. Umbilical cord derived mesenchymal stem cells useful in insulin production - another opportunity in cell therapy. *Int J Stem Cells* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 16];9(1):60–9. Available from: <https://doi.org/10.15283/ijsc.2016.9.1.60>
168. Zhao Y. Cord blood stem cells for clinical use: Diabetes and cord blood. In: Stavropoulos-Giokas C, Charron D, Navarrete C, editors. *Cord Blood Stem Cells and Regenerative Medicine*. Cambridge: Academic Press; 2015. p. 153–64.
169. Babiker NE, Gassoum A, Abdelrahman NE, Arbab M, ALDeaf SAH, El-Sheikh MAA, et al. The progress of stem cells in the treatment of diabetes mellitus type 1. *Prog Stem Cells* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 18];4(1):175–88. Available from: <https://doi.org/10.15419/psc.v4i01.184>
170. Seay HR, Putnam AL, Cserny J, Posgai AL, Rosenau EH, Wingard JR, et al. Expansion of human Tregs from cryopreserved umbilical cord blood for GMP - compliant autologous adoptive cell transfer therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 18];4:178–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2016.12.003>

171. Portilla F, Yuste Y, Pereira S, Olano C, Maestre MV, Padillo FJ. Local mesenchymal stem cell therapy in experimentally induced colitis in the rat. *Int J Stem Cells* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 18];11(1):39–47. Available from: <https://doi.org/10.15283/ijsc17074>
172. Liu W, Zhang S, Gu S, Sang L, Dai C. Mesenchymal stem cells recruit macrophages to alleviate experimental colitis through TGFβ1. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2015 [cited 2019 Jun 20];35(3):858–65. Available from: <https://doi.org/10.1159/000369743>
173. Crioestaminal. Células estaminais do sangue do cordão umbilical investigadas para o tratamento da psoríase [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2017 [cited 2019 Jun 12]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/celulas-estaminais-do-sangue-do-cordao-umbilical-investigadas-tratamento-da-psoríase/>
174. Hou R, Li J, Niu X, Liu R, Chang W, Zhao X, et al. Stem cells in psoriasis. *J Dermatol Sci* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 20];86(3):181–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.11.006>
175. Chen H, Niu J-W, Ning H-M, Pan X, Li X-B, Li Y, et al. Treatment of psoriasis with mesenchymal stem cells. *Am J Med* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 20];129(3):e13-14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2015.11.001>
176. Lee YS, Sah SK, Lee JH, Seo K-W, Kang K-S, Kim T-Y. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells ameliorate psoriasis-like skin inflammation in mice. *Biochem Biophys Reports* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 20];9:281–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.10.002>
177. Bebevida. Células estaminais mesenquimais promissoras no tratamento de Lúpus Eritematoso Sistémico [Internet]. Porto: Bebevida; 2018 [cited 2019 Jun 12]. Available from: <https://bebevida.com/pt/blog/2018/08/celulas-estaminais-mesenquimais-promissoras-no-tratamento-de-lupus-eritematoso-sistemico>
178. Wang D, Zhang H, Liang J, Wang H, Hua B, Feng X, et al. A long-term follow-up study of allogeneic mesenchymal stem/stromal cell transplantation in patients with drug-resistant Systemic Lupus Erythematosus. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 20];10(3):933–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.01.029>
179. Wen L, Labopin M, Badoglio M, Wang D, Sun L, Farge-Bancel D. Prognostic factors for clinical response in Systemic Lupus Erythematosus patients treated by allogeneic mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jun 20];7061408. Available from: <https://doi.org/10.1155/2019/7061408>
180. Barbado J, Tabera S, Sánchez A, García-Sancho J. Therapeutic potential of allogeneic mesenchymal stromal cells transplantation for lupus nephritis. *Lupus* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 21];27(13):2161–5. Available from: <https://doi.org/10.1177/0961203318804922>
181. Yang F, Li Y. Effect of mesenchymal stem cells in autoimmune arthritis. *Eur Med J*

- [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 21];3(4):130–7. Available from: <https://www.emjreviews.com/rheumatology/article/effect-of-mesenchymal-stem-cells-in-autoimmune-arthritis/>
182. Luque-Campos N, Contreras-López RA, Paredes-Martínez MJ, Torres MJ, Bahraoui S, Wei M, et al. Mesenchymal stem cells improve rheumatoid arthritis progression by controlling memory T cell response. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jun 22];10:798. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00798>
  183. Park EH, Lim H, Lee S, Roh K, Seo K, Kang K, et al. Intravenous infusion of umbilical cord blood- derived mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis: A phase 1a clinical trial. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 22];7(9):636–42. Available from: <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0031>
  184. Yu Y, Yoon K-A, Kang T-W, Jeon H-J, Sim Y-B, Choe SH, et al. Therapeutic effect of long-interval repeated intravenous administration of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in DBA/1 mice with collagen-induced arthritis. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jun 22]; Available from: <https://doi.org/10.1002/term.2861>
  185. Marmotti A, Mattia S, Castoldi F, Barbero A, Mangiavini L, Bonasia DE, et al. Allogeneic umbilical cord - derived mesenchymal stem cells as a potential source for cartilage and bone regeneration: an in vitro study. *Stem Cells Int* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 22];2017:1732094. Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/1732094>
  186. Zhang Y, Liu S, Guo W, Wang M, Hao C, Gao S, et al. Human umbilical cord Wharton's Jelly mesenchymal stem cells combined with an acellular cartilage extracellular matrix scaffold improve cartilage repair compared with microfracture in a caprine model. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 22];26(7):954–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.01.019>
  187. Chen C, Qu Z, Yin X, Shang C, Ao Q, Gu Y, et al. Efficacy of umbilical cord - derived mesenchymal stem cell - based therapy for osteonecrosis of the femoral head: A three-year follow-up study. *Mol Med Rep* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 22];14(5):4209–15. Available from: <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5745>
  188. Crioestaminal. Células estaminais do cordão umbilical eficazes no tratamento de osteoartrite [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2019 [cited 2019 Jun 14]. Available from: <https://www.crioestaminal.pt/celulas-estaminais-do-cordao-umbilical-eficazes-no-tratamento-osteoartrite/>
  189. Park Y, Ha C, Lee C, Yoon YC, Park Y. Cartilage regeneration in osteoarthritic patients by a composite of allogeneic umbilical cord blood - derived mesenchymal stem cells and hyaluronate hydrogel: results from a clinical trial for safety and proof-of-concept with 7 years of extended follow-up. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 22];6(2):613–21. Available from: <https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0157>
  190. Matas J, Orrego M, Amenabar D, Infante C, Tapia-Limonchi R, Cadiz MI, et al. Umbilical

- cord - derived mesenchymal stromal cells (MSCs) for knee osteoarthritis: repeated MSC dosing is superior to a single MSC dose and to hyaluronic acid in a controlled randomized phase I/II trial. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jun 22];8(3):215–24. Available from: <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0053>
191. You H-J, Namgoong S, Han S-K, Jeong S-H, Dhong E-S, Kim W-K. Wound-healing potential of human umbilical cord blood e derived mesenchymal stromal cells in vitro - a pilot study. *Cytotherapy* [Internet]. 2015 [cited 2019 Jun 23];17(11):1506–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.06.011>
  192. Rodgers K, Jadhav SS. The application of mesenchymal stem cells to treat thermal and radiation burns. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 23];123:75–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.10.003>
  193. Eaton EB, Varney TR. Mesenchymal stem cell therapy for acute radiation syndrome: innovative medical approaches in military medicine. *Mil Med Res* [Internet]. 2015 [cited 2019 Jun 23];2:2. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40779-014-0027-9>
  194. Cerqueira MT, Pirraco RP, Marques AP. Stem cells in skin wound healing: are we there yet? *Adv Wound Care* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 23];5(4):164–75. Available from: <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0607>
  195. Liu L, Yu Y, Hou Y, Chai J, Duan H, Chu W, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *PLoS One* [Internet]. 2014 [cited 2019 Jun 23];9(2):e88348. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088348>
  196. Jin IG, Kim JH, Wu H-G, Hwang SJ. Effect of mesenchymal stem cells and platelet - derived growth factor on the healing of radiation induced ulcer in rats. *Tissue Enginnering Regen Med* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jun 23];13(1):78–90. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13770-015-0055-x>
  197. O'Loughlin A, Kulkarni M, Creane M, Vaughan EE, Mooney E, Shaw G, et al. Topical administration of allogeneic mesenchymal stromal cells seeded in a collagen scaffold augments wound healing and increases angiogenesis in the diabetic rabbit ulcer. *Diabetes* [Internet]. 2013 [cited 2019 Jun 23];62(7):2588–94. Available from: <https://doi.org/10.2337/db12-1822>
  198. Lopes L, Setia O, Aurshina A, Liu S, Hu H, Isaji T, et al. Stem cell therapy for diabetic foot ulcers: a review of preclinical and clinical research. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 23];9(1):188. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0938-6>
  199. Whiteley J, Chow T, Adissu H, Keating A, Rogers IM. Topical application of culture - expanded CD34+ umbilical cord blood cells from frozen units accelerates healing of diabetic skin wounds in mice. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 23];7(8):591–601. Available from: <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0302>



200. Zhang Y, Wang C, Wang L, Shen B, Guan X, Tian J, et al. Large-scale ex vivo generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells. *Stem Cells Transl Med* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jun 23];6(8):1698–709. Available from: <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0057>